



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**ANÁLISIS DE TRES POLIMORFISMOS DEL
GEN DMD/DMB EN FAMILIAS MEXICANAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

Q.C. CARLOS GALILEO TODD QUIÑONES

**COTUTORES: M. en C. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza
Dr. Edmundo Bonilla González**

**ASESORES: Dra. en Biom. Mol. Ariadna Estela González del Ángel
M. en B. Exp. Miguel Macías Vega**

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2004

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología molecular del Departamento de Investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, formó parte del padrón de programas de Postgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de registro: 309-0; y actualmente se encuentra dentro del padrón de programas del PIFOP-CONACyT clave C/PFPN-2002-35-32.

Agradezco a CONACYT por otorgarme la beca-crédito con el número de registro 162573.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorena Orozco Orozco por brindarme la oportunidad de incorporarme al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría, SS.

A mis tutores M. En C. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza por aceptarme como alumno en su línea de investigación así como por su tiempo y conocimientos; y Dr. Edmundo Bonilla González por su tiempo y apoyo en la compra de reactivos cuando fue necesario.

A mis asesores Dra. Ariadna Estela González del Ángel y M. en B. Exp. Miguel Macías Vega por sus observaciones y oportunas sugerencias durante el desarrollo y escritura de tesis del proyecto.

A todos los catedráticos, ex-coordinadores y coordinador del postgrado en Biología Experimental por su importante contribución en mi formación académica.

A mis padres por todo su apoyo y consejos a lo largo del camino, a mis abuelitas Cecilia Sousa Acevedo y Minerva Guerra Chavarría por estar siempre al pendiente, a mi abuelo Manuel de Jesús Quiñones Moorillón quien siempre esta presente en todo lo que hago, a Rosa Maria González Arellano por integrarse a la familia desde hace ya algunos años y a todos mis tíos y primos.

A Oreth por todo su apoyo y paciencia incondicional, muchas gracias por estar a mi lado.

A mis compañeros de Maestría por su compañerismo y apoyo, especialmente por aquellas clases de estadística que mucho me ayudaron. Y a todos los amigos, vecinos y compañeros de universidad que he conocido a lo largo de mi estancia en el Distrito Federal.

A todos los miembros del laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Investigación en Genética Humana del INP y médicos residentes de la especialidad en Genética Humana por su apoyo y amistad que me brindaron durante mi estancia en el hospital

**ANÁLISIS DE TRES POLIMORFISMOS DEL GEN DMD/DMB EN FAMILIAS
MEXICANAS**

TESIS QUE PRESENTA EL

Q.C. CARLOS GALILEO TODD QUIÑONES

Para obtener el grado académico de
Maestro en Biología Experimental

Cotutores

M. en C. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza
Dr. Edmundo Bonilla González

Asesores

Dra. en Biom. Mol. Ariadna Estela González del Ángel
M. en B. Exp. Miguel Macías Vega

COMITE TUTORIAL

COTUTOR

M. en C. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza

Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Investigación en Genética Humana
del INP, SS.

Tel. 10840900 ext. 1306

COTUTOR

Dr. Edmundo Bonilla González

Departamento de Ciencias de la Salud

UAM-I

mundo@xanum.uam.mx

ASESORA

Dra. en Biom. Mol. Ariadna Estela González del Ángel

Departamento de Investigación en Genética Humana del INP, SS

Tel. 10840900 ext. 1306

ASESOR

M. en B. Exp. Miguel Macias Vega

Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Investigación en Genética Humana
del INP, SS.

Tel. 10840900 ext. 1306

ÍNDICE

	Lista de abreviaturas.....	1
	Introducción.....	2
1.	Clasificación de las distrofias musculares.....	3
1.1	Distrofias musculares ligadas al cromosoma X.....	6
1.2	La distrofia muscular de Duchenne.....	6
1.3	La distrofia muscular de Becker.....	8
1.4	Fenotipos intermedios.....	11
1.5	Cardiopatía familiar dilatada.....	11
1.6	Distrofia muscular tipo Emery-Dreifuss.....	11
1.7	Manifestaciones en portadoras de la distrofia muscular de Duchenne.....	13
2.0	El gen DMD y su proteína: La distrofina.....	14
2.1	Complejo glucoproteico asociado a distrofina.....	20
2.2	Patogénesis de la DMD/DMB.....	21
2.3	Tipos de mutaciones en el gen DMD.....	23
2.4	Genética de las DMD/DMB.....	26
2.5	Diagnóstico molecular de las DMD/DMB.....	26
2.6	Análisis de ligamiento genético.....	30
2.7	Diagnostico prenatal.....	33
3.	Justificación.....	34
4.	Objetivo general.....	36
4.1	Objetivos específicos.....	36
5.	Material y métodos.....	37
5.1	Algoritmo metodológico.....	37
5.2	Diseño experimental.....	38
5.3	Criterios de inclusión.....	39
5.4	Criterios de exclusión.....	39
5.5	Extracción de DNA.....	40
5.6	Síntesis de oligonucleótidos iniciadores F y R.....	42
5.7	Detección de portadoras por análisis de ligamiento.....	42
5.8	Análisis de RFLPs/VNTR (pERT87.8/Taq1, pERT87.15/Xmn1 y MP1P.....	43
5.9	Estadística.....	45
6.	Resultados.....	47
6.1	Frecuencias alélicas.....	47
6.2	Índices de heterocigocidad.....	53
6.3	Análisis de haplotipos.....	56
6.4	Índice de recombinación intragénica.....	59
6.5	Utilidad del análisis de ligamiento.....	62
7.0	Discusión.....	70
	Conclusiones.....	78
	Referencias bibliograficas.....	80

ABREVIATURAS

a.a.	Aminoácido
C	Dominio Carboxilo-terminal de la distrofina
cDNA	DNA complementario
cM	Centimorgan
cols.	Colaboradores
CPK	Creatinínfosfocinasa
CYS	Dominio rico en cisteínas de la distrofina
D.O.	Densidad óptica
DAG	Glicoproteína asociada a distrofina
DGAC	Complejo glucoproteico asociado a distrofina
DMB	Distrofia Muscular tipo Becker
DMD	Distrofia Muscular tipo Duchenne
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Mezcla de los cuatro 2-desoxirribonucleótidos, 5-trifosfato de adenina, guanosina, timina y citosina
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
F	Forward
H1-H4	Dominios bisagra de la distrofina
DMI	Distrofia Muscular con fenotipo intermedio
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
Mb	Megabases
NaCl	Cloruro de sódio
RNA _m	RNA mensajero
N	Dominio Amino-terminal de la distrofina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pERT	Del inglés "phenol-enhancement recovery technic"
R	Dominio "rod" de la distrofina
R	Reverse
RFLPs	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reverso-transcripción acoplada a PCR
STRs	Secuencias cortas repetidas en tandem (DNA microsatélite)
T	Polimorfismo RFLP pERT87.8/TaqI
TBE	Amortiguador de Tris-borato-EDTA
TE	Amortiguador de Tris-EDTA
<i>T_m</i>	Temperatura teórica calculada para alineación de un oligonucleótido iniciador
UTR	Región no traducible del mRNA
V	Volts
VNTRs (DNA minisatélite)	Secuencias repetidas en tandem de número variable
X	Polimorfismo RFLP pERT87.15/XmnI
PCR-M	Reacción en cadena de la polimerasa múltiple

INTRODUCCIÓN

El término distrofia muscular se aplica a los trastornos degenerativos primarios genéticamente determinados del músculo estriado. Este grupo de enfermedades muestra degeneración muscular en pruebas electrofisiológicas (patrón miopático), bioquímicas (elevación de enzimas de escape como la Creatinfosfocinasa CPK, entre otras) e histopatológicas (cambios distróficos en la fibra muscular). Algunos de estos padecimientos cursan con anomalías en otros órganos como corazón y cerebro¹. La afectación y severidad clínica varían ampliamente entre las diversas formas². La severidad abarca desde distrofias letales (distrofia muscular congénita y la distrofia muscular de Duchenne), hasta formas que involucran la debilidad de sólo algunos grupos musculares³. La forma de herencia puede ser recesiva ligada al cromosoma X o autosómica dominante o recesiva¹(Tabla 1). Como no existe un tratamiento realmente eficaz y definitivo para las distrofias musculares, es importante integrar un diagnóstico diferencial adecuado para establecer el pronóstico, brindar un asesoramiento genético de certeza, e inclusive poder implementar estrategias preventivas como el diagnóstico prenatal o preimplantación^{1,4,5}.

1. CLASIFICACION DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES

La clasificación de las distrofias musculares se ha realizado con base en características clínicas, como son edad de inicio, la severidad de los signos y síntomas, la progresión, los grupos musculares afectados y el patrón de herencia². Basándose en la distribución de los músculos predominantemente afectados junto al conocimiento de los genes y proteínas alteradas, las distrofias musculares se pueden clasificar en seis principales tipos: Duchenne/Becker, Emery-Dreifuss, De cintura tipos 1 y 2, Facioescapulohumeral, Distal y Oculofaríngea (**figura 1**), con la adición de la distrofia muscular congénita, en la que los grupos musculares afectados es mas generalizada⁶(Tabla 1).

Actualmente con la evaluación clínica, la historia familiar y estudios de laboratorio (histopatológico y molecular), permiten integrar un diagnóstico de certeza en la mayoría de las distrofias musculares^{6,7,8,9,10}.

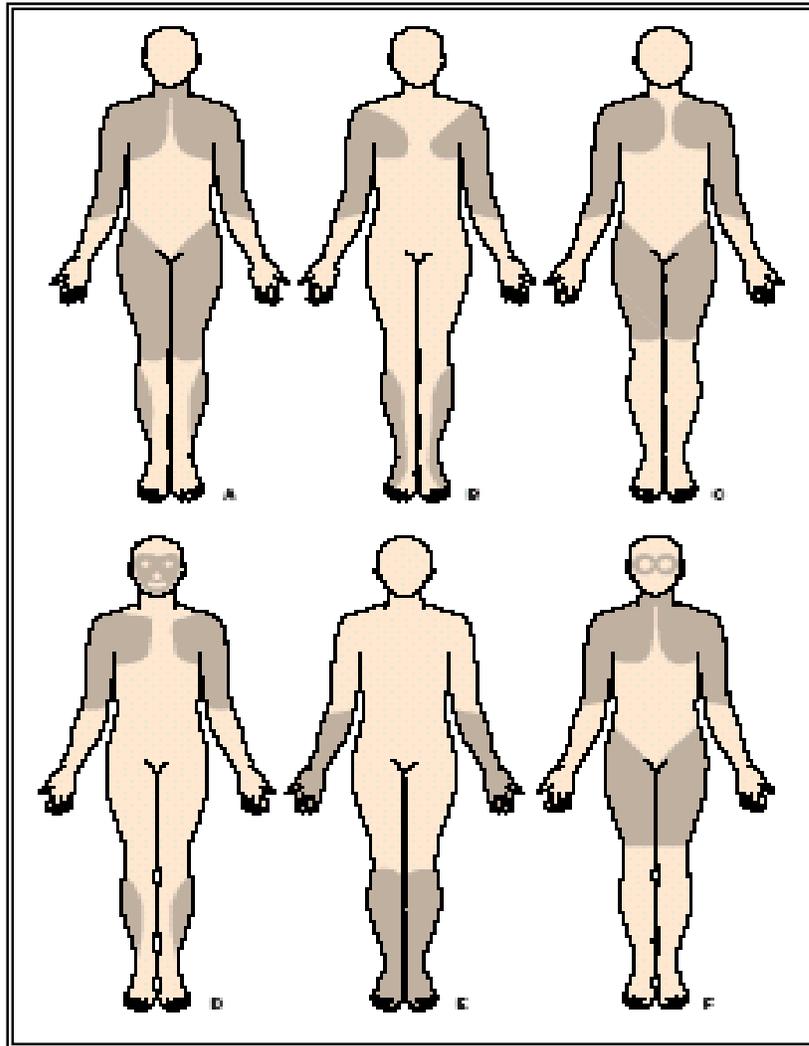


Figura 1. Distribución de los músculos predominantemente afectados en diferentes tipos de distrofia muscular. **A.** Duchenne/Becker. **B.** Emery-Dreifuss. **C.** De cintura o “Limb-girdle”. **D.** Facioescapulohumeral. **E.** Distal. **F.** Oculofaríngea.
 (Tomado de Emery AEH. Lancet 2002;359:687-95)⁶

DISTROFIA MUSCULAR	LOCUS	PROTEINA AFECTADA
CONGENITA (AR)	6q 12q 9q 1p 1p	Laminina α 2(merosina) Receptor de la laminina (α 7 integrina) Fukutina (distrofia de Fukoyama) Selenoproteína N1 (Síndrome de la espina rígida) Glucosiltransferasa (Autosómica de músculo, ojo, cerebro)
DUCHENNE Y BECKER (XR)	Xp21.2	Distrofina
EMERY-DREIFUSS (XR)	Xq28	Emerina
EMERY-DREIFUSS (AD/AR)	1q	Laminina A/C
DISTAL (AR)	2p	Disferlina
DISTAL (AD)	14q, 2q	?
FACIOESCAPULOHUMERAL (AD)	4q	?
OCULOFARINGEA (AD)	14q	Poli (A) 2(PAB 2)
DE CINTURA "LIMB-GIRDLE" (AD)		
1^a	5q	Miotilina
1B	1q	Laminina A/C
1C	3p	Caveolina 3
1D	6q	?
1E	7q	?
1F	2q	?
DE CINTURA "LIMB-GIRDLE" (AR)		
2^a	15q	Calpainina-3
2B	2p	Disferina
2C	13q	γ -Sarcoglicano
2D	17q	α -Sarcoglicano (adhalina)
2E	4q	β -Sarcoglicano
2F	5q	δ -Sarcoglicano
2G	17q	Telethonina
2H	9q	ζ
2I	19q	Relacionado a fukitina

TABLA 1. Clasificación, locus, modo de herencia y proteínas responsables de las Distrofias Musculares.

Modos de herencia: AR= Autosómica recesiva; AD = Autosómica dominante; XR = Recesiva ligada al cromosoma X. ζ = Desconocido.

(Tomado de Emery AEH. Lancet 2002;359:687-95)⁶

1.1 DISTROFIAS MUSCULARES LIGADAS AL CROMOSOMA X

Dentro de las distrofias musculares ligadas al cromosoma X se encuentran la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y sus entidades alélicas la Distrofia muscular de Becker (DMB), la cardiomiopatía dilatada familiar y diversos fenotipos intermedios^{2,6,11,12}. La distrofia tipo Emery-Dreifuss es una entidad distinta a las DMD/B cuyo locus se localiza en Xq28¹³. Las DMD y las DMB constituyen el 95% de todos los casos de distrofias musculares que afectan a las cinturas pélvica-escapular y que cursan con cambios distróficos en la biopsia muscular^{10,14}. Estas cifras quizá reflejen el alto grado de mutabilidad prevalente en el gen DMD¹⁵.

1.2 LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

La DMD es la enfermedad neuromuscular hereditaria más frecuente en el ser humano, así como una de las más severas^{16,17,18}. Descrita inicialmente en 1851 por Edward Meryon, médico inglés¹⁹, sin embargo sus observaciones fueron negadas durante años²⁰ y ésta enfermedad posteriormente fue redescubierta por el médico francés Guillaume Benjamín Amand Duchenne quien detalló la clínica y los cambios histopatológicos del músculo algunos años después^{21,22}.

La DMD tiene una incidencia a nivel mundial de 1 en 3500 varones recién nacidos vivos^{23,24,25}. Esta enfermedad se manifiesta alrededor de los 2 años de edad con dificultad en la deambulación, caídas frecuentes, mialgias, calambres musculares, dificultad para correr, saltar y posteriormente para subir escaleras. Los grupos musculares afectados pertenecen primeramente a la cintura pelvifemoral y

posteriormente a la escapulohumeral, con lordosis compensatoria, escoliosis y contracturas en el talón de Aquiles. También se hacen evidentes la pseudohipertrofia de los gemelos y el signo de Gowers (**figura 2**). Alrededor de los 11 y 12 años el paciente pierde la capacidad de deambular y el 90% de los casos fallece en el transcurso de la segunda década de vida debido a insuficiencia respiratoria crónica y bronconeumonía¹. Se ha reportado que hasta en el 80% de los casos se presenta cardiomiopatía en diversos grados, documentada por electrocardiograma, ecocardiograma u otros estudios dinámicos, sin embargo sólo en el 10% de los casos (pacientes que llegan a la tercera década de vida) condiciona la muerte^{11,26,27,28}. Aproximadamente el 20% de los afectados presentan un coeficiente intelectual igual o menor de 70^{29,30,31,32}. El estudio electromiográfico revela patrón miopático. La CPK se encuentra elevada de 50 a 100 veces sobre el valor de referencia al inicio de la enfermedad, disminuyendo progresivamente hasta las etapas finales de la enfermedad como consecuencia de la disminución de la masa muscular. La biopsia muscular revela cambios distróficos (**figura 3**) aún cuando se realice en neonatos sin sintomatología. En etapas avanzadas o terminales se aprecia un reemplazo total del tejido muscular por tejido conectivo y adiposo, situación indistinguible de otros procesos miodegenerativos tardíos¹.

1.3 Distrofia Muscular de Becker (DMB)

La DMB fue descrita en 1955 por Becker y Kiener^{33,34}, y aunque la consideraron como una entidad distinta, en 1967 Zellweger y Hanson, lograron definir que se trataba de una forma "benigna" de la distrofia de Duchenne². Con el uso de marcadores genéticos y la clonación del gen se logró determinar que ambas enfermedades son entidades alélicas^{35,36}. La frecuencia de esta enfermedad se ha calculado en 3-5 afectados por 100,000 varones recién nacidos vivos, ocurriendo diez veces menos que la DMD^{28,37}. En la DMB, la distribución de los músculos afectados es similar a la DMD, sin embargo el curso de la enfermedad es más benigno. El inicio y progresión de los síntomas es muy variable ya que estos pueden ocurrir entre los 5 y 15 años, aunque se han reportado pacientes que inician el padecimiento entre la tercera y cuarta década de vida.

Los pacientes DMB pierden la capacidad de deambular después de los 16 años^{1,2,6,7,13}. Aunque algunos casos pueden llevar un patrón de vida normal hasta los 30 o 40 años, la muerte sobreviene entre la cuarta y quinta década de vida frecuentemente por la cardiomiopatía dilatada³⁸.

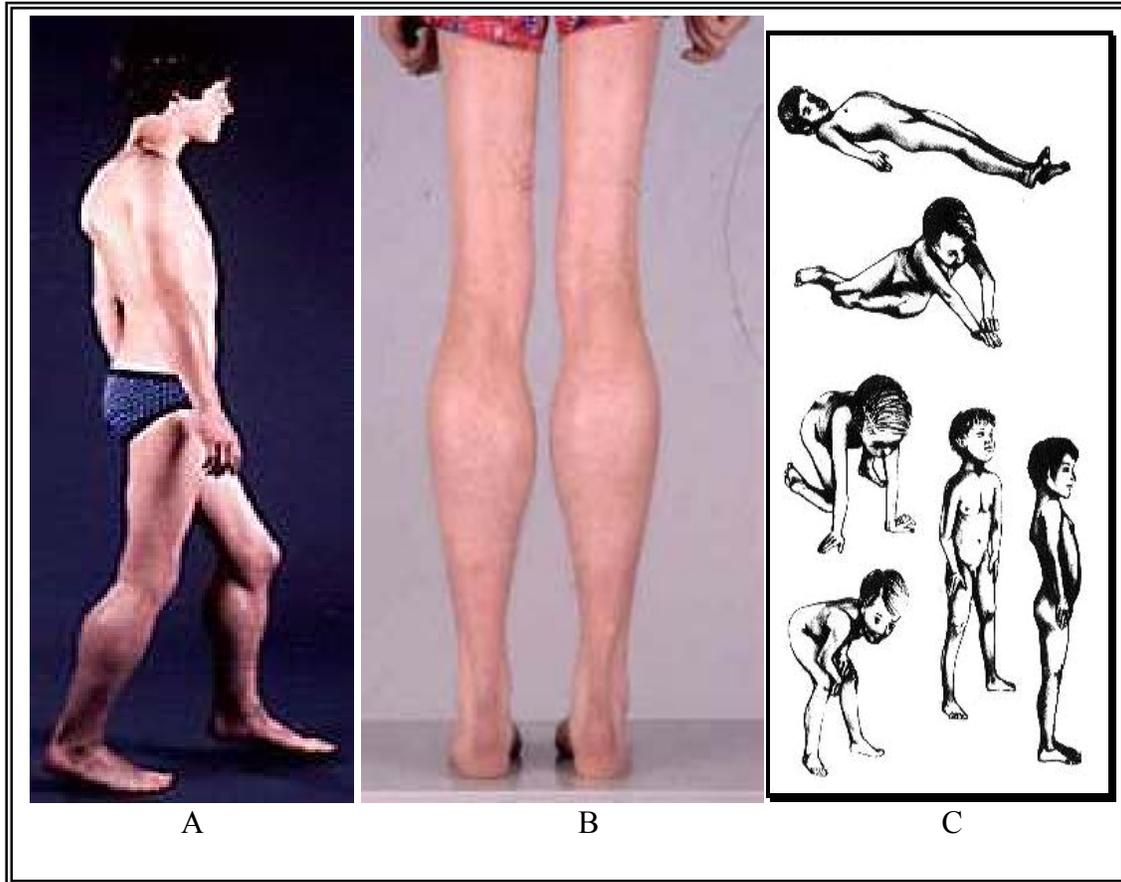


Figura 2. A: Paciente con DMD e hiperlordosis lumbar. B: Paciente con DMD, en el que se aprecia la franca pseudohipertrofia de los gemelos y otros grupos musculares femorales. C: Signo de Gowers que evidencia la debilidad de las masas musculares de la cintura pélvica y dorsal común en niños DMD al solicitar que adquiera la posición supina a partir de decúbito dorsal. Clásicamente inicia con la posición de ambas manos en el piso para obtener el punto de apoyo inicial, seguido de la elevación de ambas rodillas (segundo punto de apoyo); así el peso del tronco es superado y el individuo logra ponerse de pie.

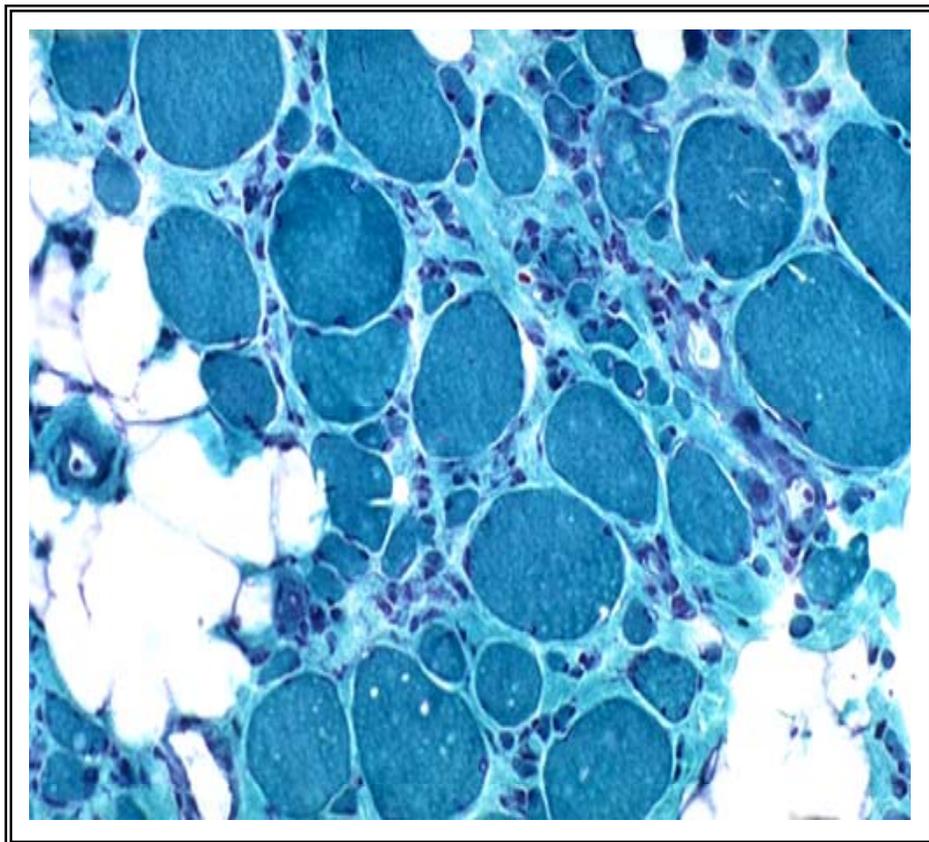


Figura 3. Histopatología de la biopsia muscular de un paciente con DMD. Resalta la sustitución del tejido muscular por elementos conectivos (fibrosis endomisial) y tejido adiposo; así como la degeneración/regeneración e irregularidad del diámetro de las fibras musculares.

1.4 FENOTIPOS INTERMEDIOS (DMI)

Este fenotipo fue reportado en 1983 por Broocke, quien describió a un grupo de pacientes DMD con una evolución menos agresiva y sin llegar a conformar un cuadro de DMB. Iniciando el cuadro clínico alrededor de los tres años de edad y conservando la capacidad de deambular independientemente hasta los 12 o 16 años de edad, sin embargo los pacientes fallecían entre los 20 y 30 años^{39,13,40}.

1.5 CARDIOMIOPATÍA FAMILIAR DILATADA

La cardiomiopatía familiar dilatada, recesiva ligada al cromosoma X, es una entidad letal, que conduce a la muerte antes de los 30 años por insuficiencia cardiaca, si el paciente no recibe transplante de corazón. El análisis de ligamiento permitió asignar al gen DMD como el responsable¹³. Característicamente se observa pérdida selectiva de la distrofina en músculo cardiaco, en tanto permanece normal o ligeramente disminuída en músculo esquelético^{41, 42}.

1.6 DISTROFIA MUSCULAR TIPO EMERY-DREIFUSS

Descrita por primera vez en 1961 por Dreifuss y Hogan, como una distrofia muscular benigna, con patrón de herencia recesivo ligado al cromosoma X, llegándose incluso a considerar como una variante benigna de la DMD. Sin embargo el estudio minucioso de la enfermedad claramente demostró que se trataba de una entidad distinta caracterizada por contracturas importantes e

invariablemente por compromiso cardiovascular. Actualmente esta entidad difícilmente se confunde con otras distrofias musculares¹.

Clásicamente se caracteriza por una tríada de manifestaciones. Primero se presentan contracturas (antes de que la debilidad muscular se haga clínicamente evidente) en el tendón de Aquiles, codos y músculos cervicales posteriores, con una limitación en la flexión de codo. Segundo, la debilidad muscular progresa lentamente con una distribución escápulohumeral y de los músculos de la región peroneal (proximal en los miembros superiores y distal en los miembros inferiores). Tercero, se presenta cardiomiopatía con defectos en la conducción, como bradicardia, prolongación de los intervalos PR, hasta un completo bloqueo cardiaco. La enfermedad cardíaca se hace evidente usualmente alrededor de los 30 años^{43,44}. El gen responsable se localiza en Xq28 y codifica para una proteína de membrana denominada emerina⁴⁵. En la mayoría de los casos, existe una ausencia total de esta proteína en músculo. La emerina se localiza en la cara interna de la envoltura nuclear de los miocitos y de otras estirpes celulares, donde quizá cumple funciones de translocación núcleo-citoplasma. También se le ha localizado con relativa abundancia en los discos intercalares, lo que correlaciona con la severa afectación cardíaca en los pacientes^{46,47}. Se han descrito familias con herencia autosómica dominante como autosómica recesiva de esta distrofia, clínicamente similar a la ligada a Xq28, pero que se originan por mutaciones en el gen LMNA localizado en 1q21, que codifica para las lamininas A y C⁴⁸. El diagnóstico

diferencial debe confirmarse por estudios moleculares. Existen casos en los que pueden surgir manifestaciones cardíacas en ausencia de debilidad muscular^{49,50}.

1.7 MANIFESTACIONES EN PORTADORAS DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

Las DMD/DMB pueden expresarse en sujetos femeninos^{1,51,52,53,54,55}, bajo condiciones que eliminen el alelo normal, como monosomías de cromosomas sexuales (síndrome de Turner)^{2,56,57,58}, translocaciones cromosoma X/autosoma^{59,60,61,62}, inactivación preferencial del X normal^{63,64,65}, etc. Un ejemplo de inactivación no aleatoria es la presencia de DMD en una de dos gemelas monocigóticas portadoras, donde se demostró que la gemela afectada presentó una inactivación preferencial del cromosoma X normal^{66,67}. Estudios recientes muestran que no existe una clara correlación entre el porcentaje de inactivación del X en leucocitos con la cantidad de CPK en suero, los signos clínicos o la proporción de fibras musculares distrofina negativas observadas en biopsia de músculo⁶⁸.

Aproximadamente el 5-10% de las portadoras muestran algún grado de debilidad muscular y son llamadas portadoras sintomáticas. En tales casos, la debilidad se presenta en forma asimétrica y bien puede presentarse desde la infancia o no hacerse evidente hasta que la mujer es adulta, pudiendo ser escasamente progresiva o permanecer estática. Debido a que la debilidad es esencialmente proximal, el diagnóstico diferencial con la distrofia de cinturas es

imprescindible para el consejo genético⁶. Aproximadamente el 8% de las portadoras pueden desarrollar cardiomiopatía dilatada o disfunción ventricular de distinta gravedad, incluso sin presentar síntomas de debilidad muscular³⁸.

2.0 EL GEN DMD Y SU PROTEÍNA: LA DISTROFINA

El gen de la distrofina se localiza en el cromosoma X (Xp21.2)^{18,35,69,70}, fue localizado gracias a estudios citogenéticos y de análisis de ligamiento genético, lográndose su clonación en el año de 1987⁷¹. Abarca aproximadamente 2.4 megabases (Mb) lo que lo hace el gen más grande del ser humano⁷²(**figura 4**). El control de la transcripción es complejo^{73,74} y existen descritos hasta este momento 8 promotores responsables de la expresión celular constitutiva y tejido específica de las diferentes isoformas de la distrofina (**figura 5**). Al menos 3 de ellos controlan las isoformas muscular, neuronal y cerebelosa de las distrofinas completas de 427 kDa^{75,76,77}. El gen consta de 79 exones y se transcribe en un RNAm de 14 kilobases (kb)⁷⁸. Se ha demostrado que la transcripción y el corte y empalme del RNAm (splicing), requiere de 16 horas para completarse¹. La expresión es predominantemente en músculo esquelético y cardíaco, aunque se han demostrado isoformas mas pequeñas, específicas en sistema nervioso central (140kDa), células de Schwann (116kDa), células gliales (71kDa) y en retina (260kDa)^{79,80,81}.

La distrofina de 427 Kda pertenece al grupo de proteínas de unión a actina, de la superfamilia de las espectrinas. Conformar el 5% del total de proteínas del

citoesqueleto subsarcolémico y el 0.001% del total de proteínas de la fibra muscular estriada. Contiene 4 regiones en "bisagra" (H1-H4) ricas en prolina (**figura 6**), a las que se les atribuye la flexibilidad de la proteína, así como otros 4 dominios:

1. El dominio N-terminal presenta tres sitios de unión (a.a 14-240) para filamentos de actina en la línea Z y M del sarcómero (actina F).
2. El dominio "rod" (a.a 278-3080) consiste en una serie de 24 secuencias repetitivas de 109 aminoácidos, que le otorgan la conformación de triple α -hélice, semejante a espectrina y además se ha sugerido que podría ser un sitio alternativo de unión a actina.
3. El dominio rico en cisteínas (a.a 3081-3360) que esta involucrado en la unión al β -dístroglicano del complejo glucoproteico asociado a distrofina (DGAC).
4. El dominio C-terminal, que se encuentra altamente conservado en vertebrados, además de que es único en la distrofina y en una proteína homóloga a la distrofina denominada utrofina, cuyo locus se ubica en el cromosoma 6.

Los 4 dominios suman un polipéptido altamente hidrofílico de 3,658 aminoácidos, con extremos globulares y una longitud de 175nm (**figura 6**)^{82,83,84}.

En el músculo esquelético, la distrofina se localiza en unas estructuras denominadas costámeros, que consisten en conexiones transversas entre las

miofibrillas y el sarcolema del músculo esquelético, principalmente a nivel de la línea Z. La posición estratégica de los costámeros junto a la línea Z, conduce a un "pleglamiento" ordenado de la membrana, paralelo a la contracción de la sarcómera. Este mecanismo protege al músculo del efecto de la contracción⁸⁵. La distrofina se une al citoesqueleto de actina F y al sarcolema mediante el complejo glucoproteico asociado a distrofina (DGAC), que se ancla con la matriz extracelular (**figura 7**), cumpliendo la función de puente entre estos, favoreciendo de este modo una mecánica ordenada de la contracción muscular⁸⁶.

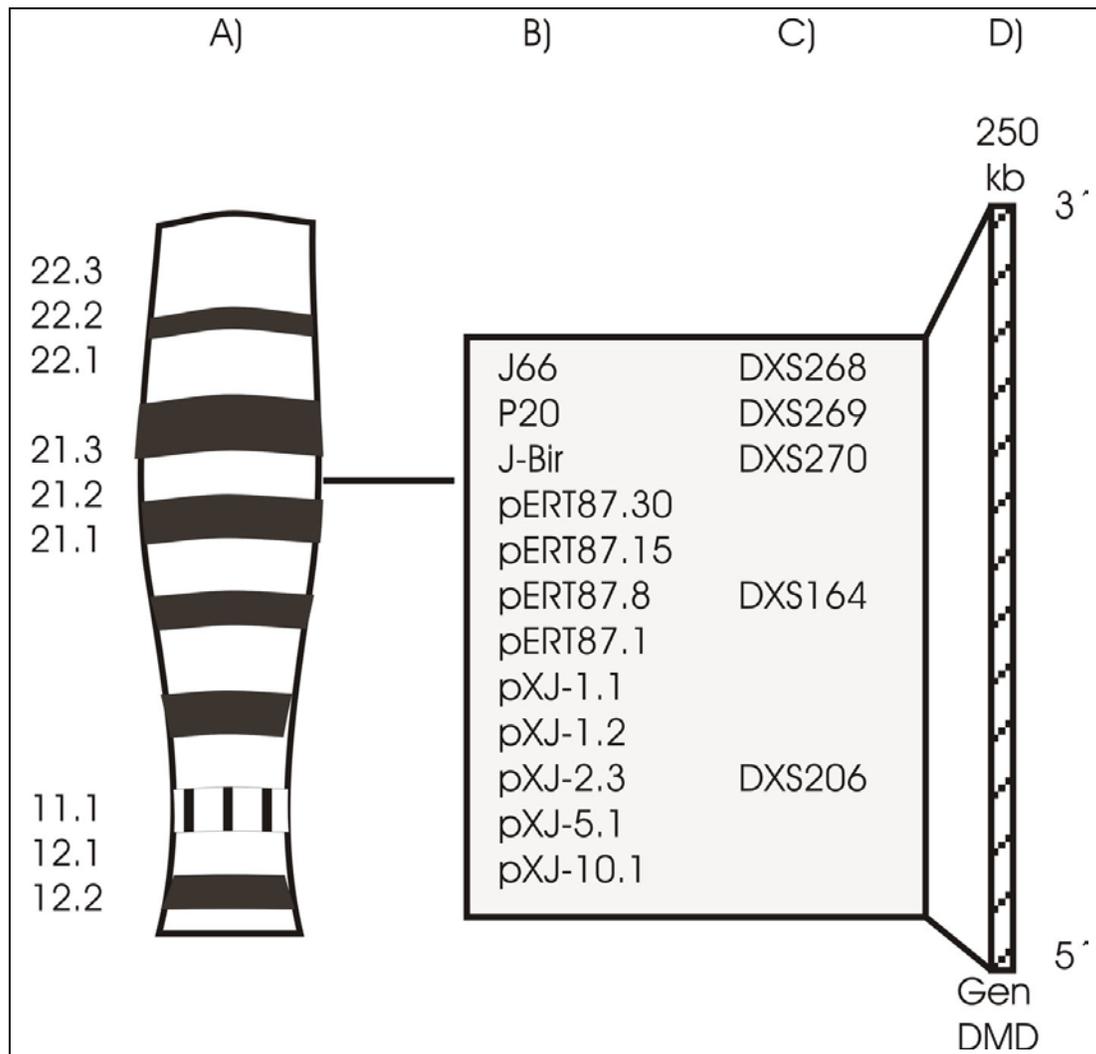


Figura 4. Ubicación del gen DMD en el cromosoma X de humanos. A) Mapa citogenético del brazo corto del cromosoma X. B) y C) Posición de los marcadores genéticos (C) y sondas (B) descritos para Xp. Destacan los marcadores DXS206 (sondas pXJ) y DXS164 (sondas pERT87), como los primeros que demostraron estar estrechamente ligados a DMD/B. (D) Kilobases que ocupa el gen DMD.

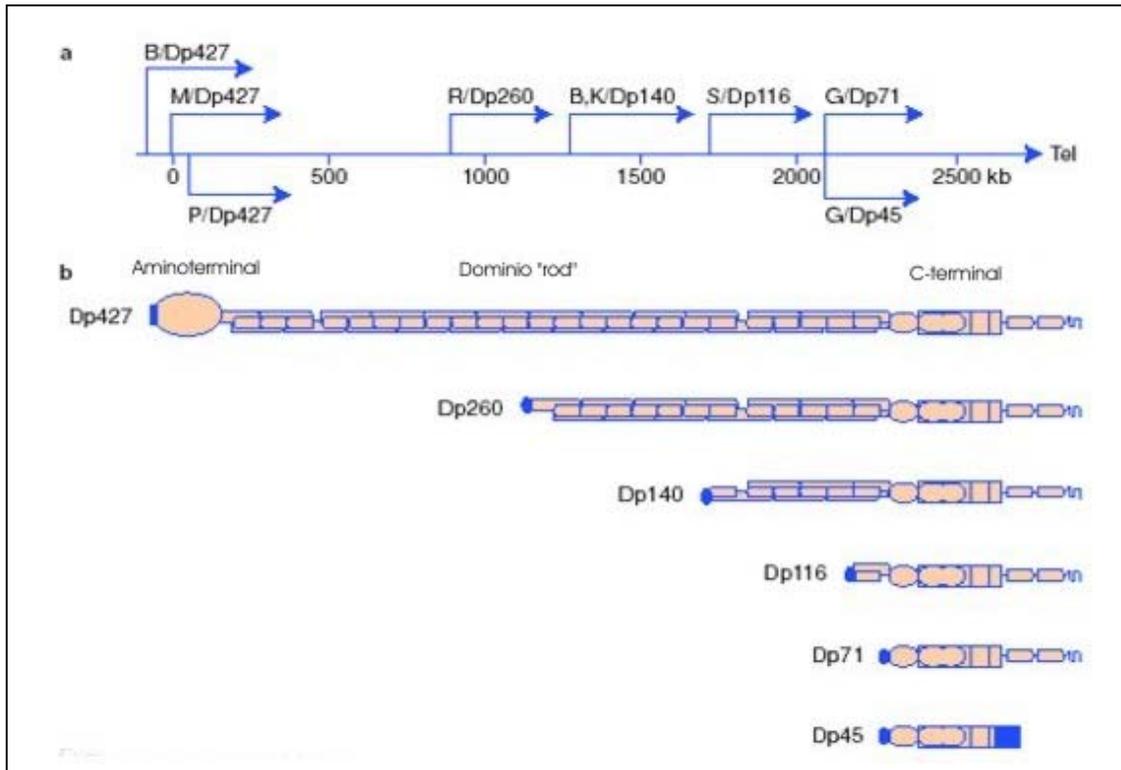


Figura 5. Isoformas codificadas por el gen de la distrofina. (a) Representación del gen de la distrofina mostrando la posición de los 8 diferentes promotores (B, cerebro; M, músculo; P, Purkinje; R, retina; B, K, cerebro y riñón; S, células de Schwann; G, general). **(b). Esquematización de las isoformas de la distrofina.** Comparando los principales dominios de la distrofina Dp427 con los de la Dp260, 140, 116, 71 y 45. Únicamente la Dp427 contiene el dominio amino-terminal de unión a actina, pero la mayoría de las otras isoformas contienen la triple hélice de repeticiones semejantes a espectrina o dominio “rod” y los subdominios de la región C-terminal.

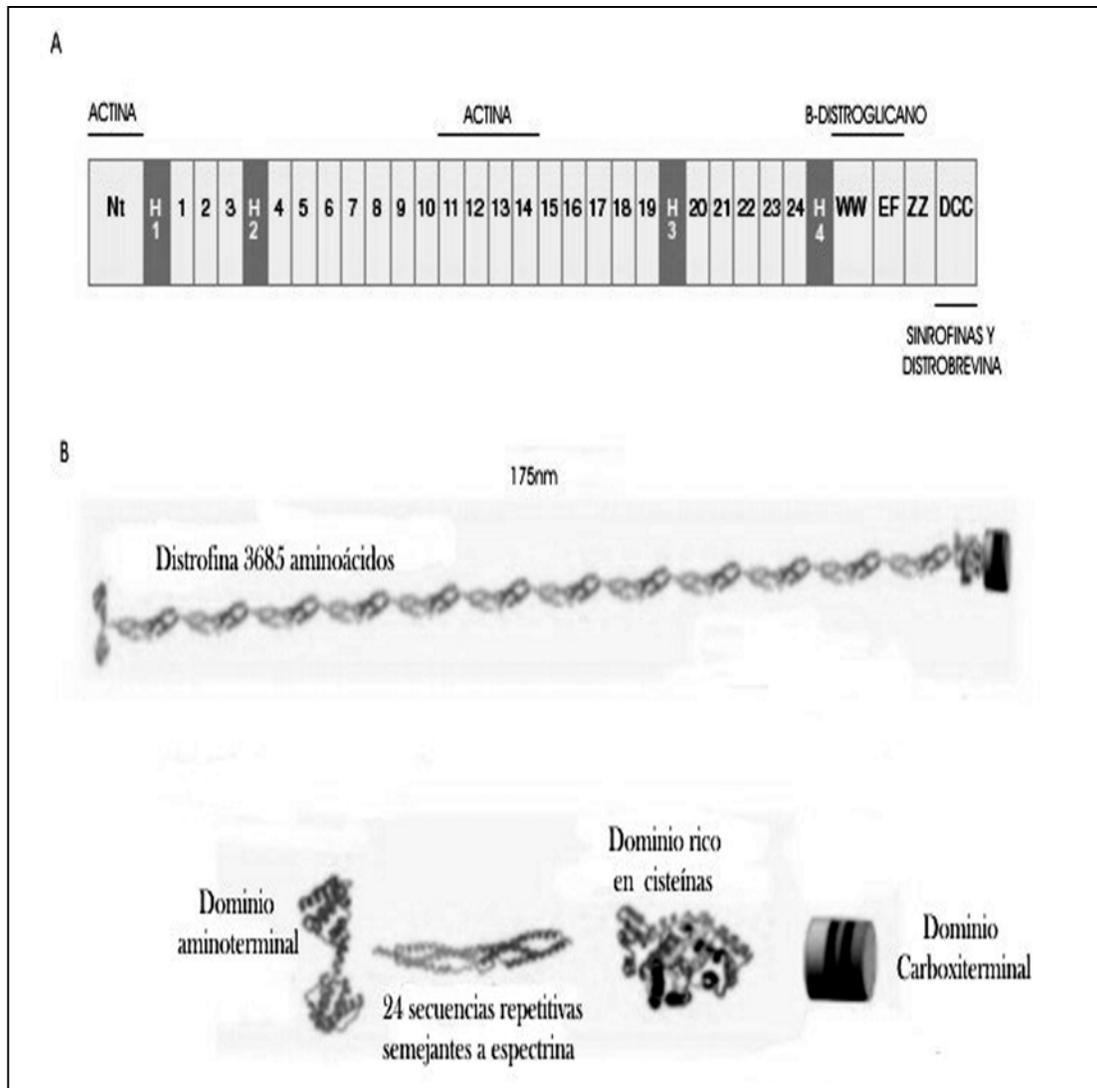


Figura 6. Estructura e interacciones de la distrofina. (A). Representación de la distrofina, mostrando los principales dominios (Amino-terminal, “rod” de 24 repeticiones de 109 aminoácidos, rico en cisteínas y carboxiterminal) e interacciones de la isoforma de 427 kDa (con la actina, β -distroglicano, sintrofinas y la distrobrevina). H: Regiones “bisagra” ricas en prolinas, responsables de la flexibilidad de la proteína. Como subdominios del dominio C-terminal encontramos un sitio de unión a proteínas “WW” con el que se une al β -distroglicano, a una mano “EF” dependiente de Ca^{2+} que estabiliza la unión de WW, un dominio de dedo de zinc “ZZ” y un dominio “DCC” (coiled-coil) con el que interactúa con la sintrofina y distrobrevina. **(B).** Modelo tridimensional de la distrofina Dp427 con sus respectivos dominios.

2.1 COMPLEJO GLUCOPROTEÍCO ASOCIADO A DISTROFINA (DGAC)

El DGAC está constituido por al menos 7 polipéptidos denominados α -sarcoglicano o adhalina (50 kDa), β -sarcoglicano (43 kDa), δ -sarcoglicano (35 kDa), ε -sarcoglicano (50 kDa), γ -sarcoglicano (35 kDa), sarcospan o 25DAP, β y ∞ distroglicano; este último heterodímero se une a la laminina^{86,87}. También forman parte del complejo las sintrofinas α , β 1 y β 2, la distrobrevina, caveolinas y la óxido nítrico sintetasa^{87,88} (**Figura 7**). El DGAC se ha dividido en tres subcomplejos: el complejo de distroglicanos, el complejo de sarcoglicanos y el complejo citosólico, que comprende a las sintrofinas, distrobrevina, caveolinas y la óxido nítrico sintetasa (nNOS). Existen algunas diferencias en la organización y composición del DGAC y distrofina en el sarcolema de la placa neuromuscular y la unión miotendinosa, desconociéndose su significado⁸⁷. Actualmente es posible realizar por inmunohistoquímica una evaluación integral de cada uno de estos componentes implicados en el desarrollo de algunos tipos de distrofias^{9,10,89}. En los pacientes con DMD se observa una desorganización del DGAC, así como una disminución significativa de los complejos sarcoglicano y distroglicano. Debido a la estrecha relación que existe entre los componentes del DGAC con la distrofina y merosina, la alteración de estas últimas o de alguno de los componentes del DGAC producen cambios distróficos de la fibra muscular y una redistribución secundaria de los componentes del DGAC^{9,10}. Actualmente ha quedado claro que la existencia de mutaciones en los genes de alguno de los componentes de sarcoglicano y algunos componentes citoplasmáticos asociados al DGAC (disferina, caveolina-3,

calpaina, etc) conducen a otros fenotipos de distrofia muscular, inclusive con un curso clínico incapacitante, letal y difícilmente distinguible de las distrofias musculares ligadas a Xp21.2^{3,90,91,92}.

2.2 PATOGÉNESIS DE LA DMD/DMB

La deficiencia cuantitativa o cualitativa de la distrofina o de alguno de los componentes del DGAC, ocasiona ruptura del sarcolema durante la contracción y relajación muscular^{9,52,91,93}, siendo entonces la degeneración muscular la consecuencia más relevante de estas patologías. La sustitución de tejido muscular por componentes conectivos y adiposos (fibrosis endomisial) forma parte de la fisiopatología de la enfermedad⁹⁴.

La correlación entre el dominio dañado de la distrofina y el fenotipo DMD o DMB ha resultado un tema controversial^{13,95,96,97}. El único consenso predictivo que relaciona el tipo de alteración en la distrofina con el fenotipo, es dependiente del marco de lectura⁵¹. En los pacientes con DMD, las mutaciones presentes en el gen generan un cambio en el marco de lectura, en tanto que en los pacientes con DMB éste se conserva. Así la eliminación de exones que corren el marco de lectura, condicionan un fenotipo grave tipo Duchenne, mientras que aquellos que no ocasionan corrimiento del marco de lectura, se correlacionan frecuentemente con el fenotipo menos agresivo o Becker^{13,52}. Este consenso se apoya en la hipótesis de Mónaco⁵¹, la cual propone que las deleciones que no provocan corrimiento del

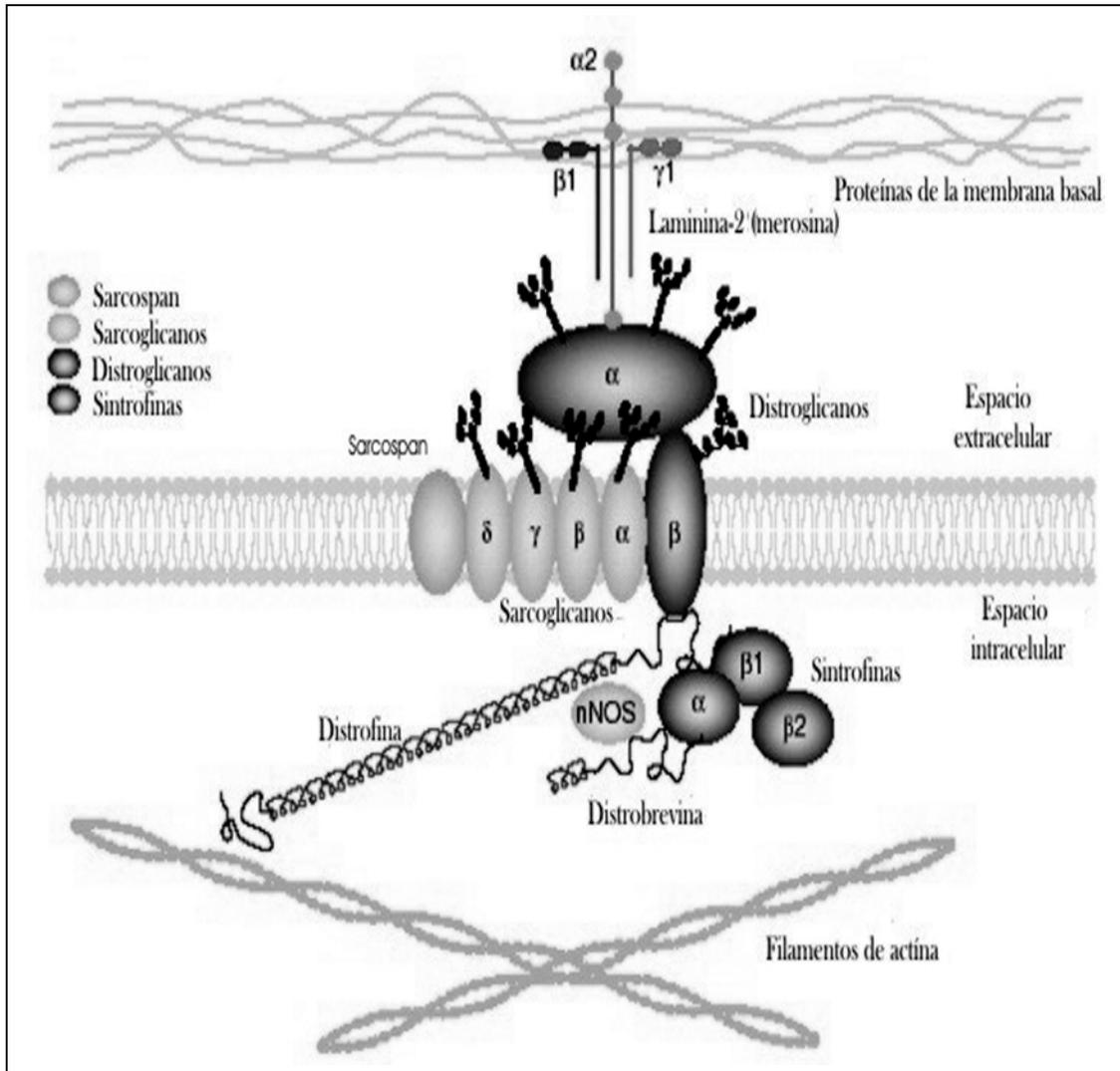


Figura 7. Organización del complejo distrofina-DGAC (complejo glucoprotéico asociado a distrofina). La distrofina forma un enlace entre el citoesqueleto de actina y la matriz extracelular vía los distroglicanos. El sarcospan y los sarcoglicanos estabilizan el complejo de membrana. El complejo intracelular incluyendo a las sintrofinas y distrobrevinas junto con la distrofina estabilizan a la óxido nítrico sintasa (nNOS) en su posición subsarcolémica. Entonces la distrofina y las proteínas asociadas cumplen un doble papel estructural y de señalización en la fibra muscular. La pérdida de este complejo como resultado de mutaciones en el gen de la distrofina o de alguna de las proteínas asociadas, conduce a una distrofia muscular.

marco de lectura producen una proteína con función residual asociada al fenotipo Becker, e idealmente se confirma analizando el marco de lectura de los fragmentos de unión resultantes de los exones conservados en el transcrito maduro^{98,99,100}. Para correlacionar el estudio de la proteína y el fenotipo observado, el análisis del transcrito es altamente informativo, ya que en él se pueden valorar aspectos de (splicing) alternativo aberrantes en un gen DMD que en muchos casos explica la discrepancia en los hallazgos de la proteína y el marco de lectura⁹⁹. Se considera que la delección completa del gen o translocaciones X:autosóma, condicionan en todos los casos fenotipos DMD¹. Se ha propuesto que excepciones a la hipótesis de Mónaco, consistentes en pacientes DMD y la presencia de una distrofina anómala^{101,102,103,104} o pacientes DMB con una proteína reducida en su expresión (abajo del 10%)^{103,104,105} o severamente dañada (con 45% menos de su secuencia)^{40,106,107}, pueden deberse a la funcionalidad residual de los dominios clave de la proteína (Amino-terminal y dominio rico en cisteínas), los que participan en funciones indispensables tales como dirigir correctamente la localización de la distrofina hacia el subsarcolema, su correcto ensamble y unión estable con los componentes del DGAC o la conservación de la vida media de la propia distrofina⁹⁹.

2.3 TIPOS DE MUTACIONES EN EL GEN DMD

La tasa de mutación del gen DMD es 10 veces mayor en comparación con cualquier otro gen (1×10^4 meiosis)¹. Las delecciones intragénicas de tamaño variable, son las responsables de aproximadamente el 60% de los casos con

DMD/DMB, siendo estas muy heterogéneas ya que, se puede encontrar deletado desde un exón hasta el gen completo¹⁰⁸. Las duplicaciones parciales intragénicas están presentes en el 6-8% de los casos¹⁰⁹ y en la última década también se han caracterizado un número importante de mutaciones puntuales con diversos efectos sobre la expresión del gen¹¹⁰.

Múltiples estudios han demostrado dos sitios del gen altamente susceptibles (puntos calientes) para sufrir deleciones parciales. Uno de ellos abarca los primeros 20 exones, mientras que el otro se encuentra ubicado entre el intrón 44 y los exones 53 al 55¹¹¹. Menos del 3% de las deleciones se originan hacia el extremo 3'^{109,112}.

Los mecanismos de deleción pueden explicarse con base en fenómenos de ruptura atribuibles a mecanismos de recombinación o algún rearrreglo especial del gen en la cromatina^{111,112,113,114}. Dichos eventos pueden tener lugar durante la meiosis o durante la mitosis en etapas tempranas de la embriogénesis^{57,63,115}. La presencia de dos sitios calientes entre los exones 1 al 20 y del 43 al 55, sugiere la presencia de una característica especial que predispone a estas zonas a fenómenos de ruptura y pérdida; Por ejemplo, el intrón 44 posee secuencias ricas en A-T y secuencias polimórficas de repetidos CA (probablemente involucradas en la recombinación)¹¹⁶, e incluso un elemento tipo transposón^{117,53,63}. Las duplicaciones obedecen a los mismos mecanismos que dan por resultado deleciones, aunque aún

está en discusión si éstas se generan en gran cantidad en la línea germinal paterna a través de intercambios de cromátidas hermanas^{62,118}.

Menos de una tercera parte de los pacientes con DMD/DMB son debidos a mutaciones puntuales que conducen a la creación de codones de terminación, eliminación de sitios de splicing alternativo, inactivación o disminución de la función promotora y mutaciones de sentido erróneo¹¹⁰. Existen descritas más de 150 mutaciones (incluyendo microdeleciones, microinserciones, etc) con diversos efectos en la proteína, siendo la mayoría de ellas creadoras de codones sin sentido y de la afectación de los sitios de corte y empalme alternativos y del sitio de ramificación, así como la creación de sitios críticos de corte y empalme alternativos^{110,119}. Existen evidencias que indican que la mayoría de las mutaciones puntuales se originan en la espermatogénesis^{115,120}. Cabe mencionar que no existe un sitio caliente para las mutaciones puntuales¹¹⁰, aunque se ha propuesto la existencia de algunas regiones con características particulares en la secuencia primaria que condicionan mutaciones puntuales generadas de forma no aleatoria^{119,121,122,123}.

Otras mutaciones poco frecuentes reportadas incluyen a un caso de DMD causado por la inserción de un elemento retrotransponible L1 en el exón 44 del gen¹²⁴, y dos casos familiares debidos a inversiones, una pericéntrica¹²⁵ y otra paracéntrica¹²⁶; ambos afectando a la banda Xp21.2.

2.4 GENETICA DE LAS DMD/DMB

Las mutaciones que ocurren en el gen DMD pueden originarse como resultado de un evento *de novo* en aproximadamente el 30% de los casos o puede ser heredado de una madre portadora en el restante 70%. Esta proporción fue establecida desde 1956, aún sin conocer el gen y de acuerdo a cálculos basados en genética de poblaciones^{14,51,52}. Sin embargo algunos estudios⁵³, incluyendo uno en población mexicana⁵⁴, sugieren que la cifra de mutaciones *de novo* debe ser reconsiderada. Asimismo se ha reportado en algunas poblaciones un alto número de casos aislados, lo que indica una alta tasa de mutaciones originadas como evento *de novo*^{55,56}.

Condiciones como el mosaicismo somático^{57,58} y germinal^{59,60,61} han sido descritas para las DMD/DMB. Las cifras reportadas para el mosaicismo germinal van del 8-14% en familias con DMD/DMB con casos únicos, aunque esta cifra aún no se ha definido por completo^{60,62}. Aparentemente estos datos también varían de acuerdo a la mutación presente en el gen DMD. Así Passos-Bueno y colaboradores han demostrado que familias con casos únicos con delección en la región 5' tienen un 30% más de riesgo que aquellos con delección central de ser originados por mosaicismo germinal⁶³.

2.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LAS DMD/DMB

A mediados de la década de los ochentas y en los primeros años de los noventas, el Southern blot fue la técnica utilizada para diagnosticar a las

DMD/DMB. Este análisis requiere el uso de enzimas de restricción, que cortan el ADN en sitios específicos y de 7 a 12 sondas que abarcan la longitud total del DNAC, para detectar duplicaciones parciales y deleciones en pacientes y portadoras^{2,35,109,127,128}.

En el año de 1985 se logró clonar fragmentos aledaños a la región Xp21, incluyendo un fragmento de ADN que contenía una pequeña parte del gen DMD, denominado como pERT87⁶⁹. Utilizando a este fragmento como sonda en el Southern blot, se logró detectar deleciones en el 10% de los casos con DMD¹²⁹.

Con la caracterización de la secuencia del gen DMD, el Southern blot ha sido sustituido en gran parte por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esto debido al menor costo, trabajo, tiempo, cantidad y calidad del DNA utilizado en el análisis por PCR múltiple, además de que no se requiere del uso de radioactividad. Chamberlain y colaboradores, propusieron en 1988 un ensayo de PCR múltiple, que permitió el análisis de numerosos exones (6) del gen DMD, representativos de los puntos calientes, logrando caracterizar el 80% de las deleciones detectadas por el estudio de Southern Blot^{130,131,132}.

En 1990, Beggs y colaboradores, propusieron el estudio de otros exones del gen DMD dentro del ensayo de PCR múltiple (con este método se logró estudiar desde el promotor hasta el exón 60. Al combinar ambos métodos, se incremento la eficiencia de detección de deleciones al 98% ¹³⁰.

Una de las agrupaciones de exones en PCR-M más utilizadas es aquella que analiza 13 exones y el promotor muscular en dos reacciones por separado (9-plex y 5-plex)^{132,133,134} o la de dos reacciones de 9 exones cada una. Los exones incluidos en el estudio por PCR-M abarcan regiones del extremo 5' y la región central del gen. Los exones amplificados, incluyen toda la secuencia codificante del exón, los sitios de corte y empalme alternativos y algunas bases de los bordes intrónicos^{129,135}. Debido a su tamaño (diferencias entre 50 y 100pb), los exones amplificados, son fácilmente visualizados en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio¹²⁰. Mediante otra estrategia utilizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría desde 1999, pueden amplificarse 20 exones y el promotor muscular-exón 1, en 4 reacciones separadas⁵⁴. La técnica de PCR-M, cuando se modifica para hacerla cuantitativa, se puede aplicar a la detección de duplicaciones, defecto no detectable por simple PCR-M. Así mismo ésta se aplica a la determinación de dosis génica en la búsqueda de mujeres portadoras^{2,132,136,137,138,139}.

El FISH (Hibridación in situ con fluorescencia), es una técnica que puede emplearse para la detección de portadoras en familias con casos de delección únicamente. Sin embargo su uso se encuentra limitado debido al alto costo del equipo requerido, aunque existen reportes de su uso¹⁴⁰.

Otra técnica de reciente creación que puede aplicarse de forma cuantitativa, es el PCR en tiempo real, obteniéndose de esta forma lecturas del amplificado mientras se desarrolla la reacción¹⁴¹.

La secuenciación para detectar mutaciones puntuales resulta sumamente laboriosa y costosa. Debido a los inconvenientes en la secuenciación directa del gen de la distrofina, muchos grupos de investigación han desarrollado recientemente estrategias para detectar variaciones en las secuencias exónicas, utilizando métodos de tamizaje, continuado por el análisis de secuenciación únicamente en los amplificados en los que se detectó una variación¹⁴².

Una de las estrategias descritas se basa en el análisis por medio de la cromatografía líquida desnaturizante de alta resolución (DHPLC) como un método de tamiz. Con esta estrategia se busca la separación de fragmentos de ADN heteroduplex, seguida de secuenciación directa de los amplificados obtenidos. Con este método se lograron detectar mutaciones puntuales en seis de ocho muestras de pacientes sin delección¹⁴². Otras alternativas descritas incluyen la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)¹⁴³ y la amplificación en condición sencilla / primer interno (SCAIP), con un único programa de temperaturas en el PCR, se amplifican los 79 exones y los productos alternativos de los promotores, seguida por el uso de un segundo juego de primers para la secuenciación. De esta forma ponen en evidencia deleciones en cualquier exón y mutaciones puntuales en caso de ausencia de delección. Los autores calculan una inversión en tiempo de 3 días con un costo aproximado en USA de \$1000.00 dólares en reactivos¹⁴⁴; convirtiéndose en una alternativa diagnóstica atractiva para aquellos pacientes sin delección caracterizada.

2.6 ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

El ligamiento genético puede definirse como la tendencia de alelos muy cercanos en el mismo cromosoma a transmitirse juntos, como una unidad intacta a través de la meiosis.

El principal valor del análisis de ligamiento en genética humana y médica es ayudar a la identificación, el mapeo y el diagnóstico de los genes que provocan una enfermedad hereditaria. En familias adecuadas entonces, es posible identificar genéticamente la herencia o segregación de un determinado gen de enfermedad, siguiendo la transmisión de otros loci estrechamente ligados, que se denominan "loci marcadores". Un análisis de ligamiento se considera eficiente cuando se ha utilizado más de un marcador, sugiriéndose utilizar un mínimo de tres.^{1,23,24,28,145}

Se les llama loci marcadores a aquellos segmentos de DNA cuya posición es conocida, utilizándose por lo general secuencias únicas y específicas de DNA que no son codificantes y cuya función es desconocida además de que son altamente variables en la población humana, es decir, son polimórficas. Las secuencias polimórficas de DNA usadas como marcadores pueden clasificarse en tres grupos principales: a). Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) en las que el polimorfismo analizado es el cambio de una base en una posición determinada, situación que provoca el reconocimiento o no del sitio por parte de una enzima de restricción, detectándose de esta forma los diferentes alelos, b).

Los minisatélites o repeticiones en tándem de número variable (VNTR) y c). Los microsátélites o repeticiones de dinucleótidos (STRs).

A las variantes de un gen o marcador en cuanto a su secuencia de bases se les denomina alelos, en tanto que a la posición de un gen o marcador se le denomina locus (plural "loci"). De este modo podemos hablar de un locus con dos o más alelos posibles. Para estudios de ligamiento los loci deben ser altamente polimórficos, es decir que es necesario que las variantes sean muy frecuentes en la población y que por lo tanto sea frecuente que una persona sea heterocigota para este locus.

El abordaje para la detección de mujeres portadoras cuando se desconoce la mutación responsable dada la inespecificidad de los marcadores bioquímicos como la creatinfosfocinasa, la isoenzima 5 de la lactato deshidrogenasa o la hemopexina, se basa en el análisis de ligamiento (tipo indirecto) utilizando marcadores intragénicos del tipo RFLPs, VNTRs y STRs, permitiendo un seguimiento del alelo mutado o en riesgo en la descendencia y en ocasiones fungiendo como un análisis de tipo directo poniendo en evidencia eventos de deleción al no amplificar uno de los alelos o duplicación al realizar la técnica de la dosis génica en casos índice y/o portadoras^{17,133,146,147,148,149,150,151}.

Existen tres limitantes importantes en la aplicación del análisis de ligamiento, la primera consiste en contar con una estructura familiar adecuada (familia extensa o casos familiares), la presencia del carácter de heterocigocidad

en al menos un marcador en la madre del propósito (la informatividad de los marcadores depende del nivel de heterocigocidad en la población, por lo tanto los marcadores seleccionados deben ser específicos para la población en estudio) y la alta prevalencia de fenómenos de recombinación intragénica documentados en el gen DMD que pueden conducir a falsos positivos o negativos en el 5-12% de los casos, especialmente cuando se utiliza un número limitado de marcadores y con distancias génicas superiores a 1cM^{28,147,130,152,153}.

Tres de los primeros RFLPs en ser utilizados en conjunto para realizar análisis de ligamiento fueron los pERT87.15/*XmnI*, pERT87.15/*BamHI* y el pERT87.8/*TaqI*, obteniendo una eficiencia en la heterocigocidad (informatividad) en al menos un marcador del 70%¹⁴⁹. Tanto pERT87.8/*TaqI* como pERT87.15/*XmnI* han continuado utilizándose en diversos países (China, India, Japón, Inglaterra y Turquía entre otros) con buenos resultados^{154,155,156,157}.

En el caso de los VNTRs uno de los primeros en utilizarse para el análisis de ligamiento fue el marcador *MPIP* que al estar situado en la región 3' sirvió a su vez para coadyuvar a la identificación de eventos de recombinación utilizado en conjunto con marcadores ubicados en la región 5' y central del gen DMD¹⁵⁸.

En cuanto a los STRs, han sido probados con buenos resultados en la población argentina, cubana, hindú y Coreana entre otras, siendo algunos de los utilizados los STR-44, STR-45, STR-49 y STR-50, obteniendo frecuencias de

heterocigocidad que rondan entre el 82% y el 86.2% para cada uno de ellos^{17,24,159,160}.

2.7 DIAGNÓSTICO PRENATAL

El diagnóstico prenatal puede utilizarse en familias con deleción caracterizada buscando la deleción en el producto, en tanto que en las familias sin mutación caracterizada es posible utilizar el análisis de ligamiento para realizar el diagnóstico prenatal. Una vez asignado el estado de portadora, el producto puede ser diagnosticado desde el primer trimestre de la gestación, utilizando amniocitos obtenidos a las 16 semanas de gestación (SDG) o a través de células trofoblásticas obtenidas a las 8-10 SDG. Aunque la recombinación intragénica (5-12%) en el gen DMD puede ser fuente de falsos positivos o negativos, situación que debe informarse a la madre del producto.^{28,146,147,148,149}.

3. JUSTIFICACIÓN

Las DMD/DMB constituyen los padecimientos hereditarios neuromusculares más frecuentes a nivel mundial, teniendo un carácter invalidante y letal en el individuo. Ante este tipo de padecimientos no existe a la fecha un tratamiento definitivo, por lo que es indispensable el asesoramiento genético para la prevención de la enfermedad.

En nuestro país, la detección de portadoras en familias con DMD/DMB se basa en métodos tradicionales indirectos, tales como la determinación de creatinfosfocinasa sérica y recientemente por PCR múltiple, dosis génica y análisis de ligamiento con RFLPs, VNTRs y STRs. La importancia de la biología molecular en este campo reside en su alta sensibilidad y especificidad para la caracterización del tipo de mutación y la detección de mujeres portadoras de estos padecimientos invalidantes, lo anterior brinda la oportunidad de otorgar un asesoramiento genético de certeza.

Se cuenta con un banco de DNA de 150 Familias DMD/DMB en el Departamento de Investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría. Sólo 41 de ellas tienen antecedentes heredofamiliares para la enfermedad, por lo que se pudo determinar el estado de portadora obligada sólo en la madre; sin embargo en las hermanas y otros familiares femeninos el estado de portadora es incierto, lo mismo que en el resto de las madres y hermanas de

los casos índice sin delección y sin caracterización de la mutación responsable; en ellas es indispensable determinar si son o no portadoras de la enfermedad.

Mediante el empleo de tres marcadores intragénicos (pERT87.8/*TaqI* (T), pERT87.15/*XmnI* (X) (RFLPs) y MP1P (VNTR)), se propone mejorar la eficiencia del asesoramiento genético al realizar el análisis de ligamiento, además de que no existen datos en la población mexicana sobre el índice de recombinación intragénica en este locus y las frecuencias alélicas respectivas.

4. OBJETIVO GENERAL

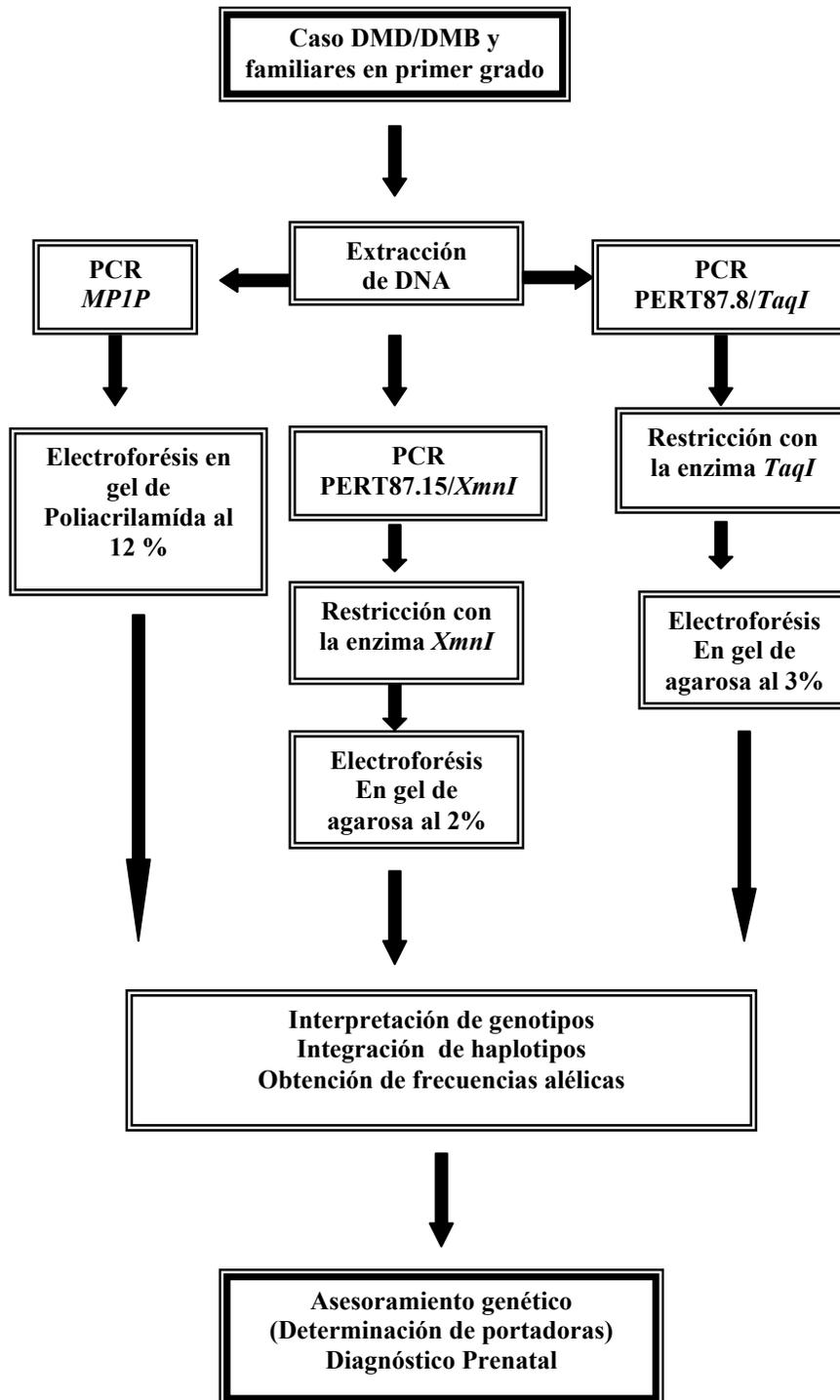
Implementar el análisis molecular de los polimorfismos pERT87.8/*TaqI* (T), pERT87.15/*XmnI* (X) (RFLPs) y MP1P (VNTR) en familias mexicanas con DMD/DMB.

4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estandarizar la amplificación, restricción (RFLPs) y análisis electroforético de los marcadores pERT87.8/*Taq I*, pERT87.15/*XmnI* y MP1P.
2. Dar a conocer las frecuencias alélicas de los tres marcadores analizados e integrar haplotipos.
3. Dar a conocer el índice de recombinación observado con los tres marcadores utilizados en el gen DMD.
4. Establecer el diagnóstico de mujeres portadoras DMD/DMB a través del análisis de ligamiento y su posible uso en el diagnóstico prenatal de DMD/DMB.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 ALGORITMO METODOLÓGICO



5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se incluyeron en el estudio un total de 150 familias no relacionadas captadas por el servicio de Genética Médica del Instituto Nacional de Pediatría, S.S y canalizadas al Laboratorio de Biología Molecular para análisis moleculares, todas constituidas al menos por un paciente afectado de DMD/DMB y su madre. Los abuelos paternos y maternos del caso índice son mexicanos de nacimiento. Para fines del análisis, sólo se incluyen a 481 individuos de las 150 familias distribuidos de la siguiente manera: 164 varones afectados, 150 madres, 28 padres, 106 hermanas de afectados y 37 hermanos de afectados. Sin embargo cabe mencionar que en algunas familias se analizaron muestras de primas y primos hermanos, sobrinas (os), abuelas, tías y tíos por rama materna (datos no mostrados).

De las 150 familias, 115 corresponden a fenotipos Duchenne, 32 a fenotipos Becker y 3 con fenotipos intermedios. Al momento de su ingreso al estudio, 57 familias (38%) tenían historia familiar positiva de DMD/DMB o madre portadora detectada por la técnica de dosis génica. Las madres portadoras obligadas de estas 57 familias, tienen antecedentes de hermano, tío o primo por rama materna con DMD/DMB u otro hijo afectado por la misma patología.

El diagnóstico de DMD/DMB/DMI se estableció con base en la historia clínica completa con elaboración de árbol genealógico, determinación sérica de CPK, electromiografía y análisis histopatológico de rutina en biopsia muscular. La clasificación de los pacientes en fenotipos DMD, DMB o fenotipo intermedio, se

realizó con base en la gravedad del cuadro clínico, tomando en cuenta la edad de inicio, evolución y edad de la pérdida de la deambulación. Así, los pacientes que dejaron de caminar antes de los 12 años se clasificaron como DMD, mientras que los pacientes con pérdida de la deambulación después de los 16 años se consideraron como DMB, en tanto que los que dejaron de deambular entre los 12 y 16 años fueron clasificados como fenotipo intermedio.

5.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1. Paciente masculino con diagnóstico de distrofia muscular tipo Duchenne o Becker o con fenotipo de gravedad intermedia, que cuenten con electromiografía, valores de CPK sérica elevados y/o biopsia muscular con datos distróficos.
2. Familiares en primer grado.

5.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

1. Familias que no cuenten con madre o caso afectado disponibles para el estudio clínico, de laboratorio, de gabinete y molecular.
2. Familias cuyo caso afectado sea mujer y no se cuenten con datos de herencia recesiva ligada al cromosoma X.
3. Familias con caso afectado cuyo diagnóstico clínico, de laboratorio y gabinete sea de una distrofia muscular diferente al tipo Duchenne/Becker.
4. Temporalmente, pacientes transfundidos en un lapso menor a tres meses.

5.5 EXTRACCIÓN DE DNA

A todos los integrantes de las 150 familias no relacionadas (casos índice, madres, padres, hermanos, hermanas) se les realizó extracción de DNA a partir de leucocitos de sangre periférica mediante la extracción fenol-cloroformo (Sambrook J y cols., 1989), con lo cual se constituyó el banco de DNA.

Se obtuvieron por venopunción 7ml. de sangre periférica en tubos Vacutainer[®] con EDTA o ACD, separándose los leucocitos por centrifugación a 2,500 rpm, se lavaron con amortiguador para células rojas y se lisaron con proteinasa K. Eliminando las proteínas por extracción fenólica, el exceso de fenol se retiró con 2 lavados de cloroformo: Alcohol isoamílico 24:1. El DNA se precipitó con NaCl y etanol a 20°C, acto seguido se lavó con etanol al 70% a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 200-300 µl de amortiguador TE pH 8.0. Para la cuantificación del DNA se realizó una dilución 1:250 de DNA : agua bidestilada y se cuantificó en un espectrofotómetro a una densidad óptica (D.O.) de 260 nm mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = (\text{DO}_{260})(\text{F})(\text{Factor de dilución})$$

donde:

DO₂₆₀: = Densidad óptica a una λ de 260 nm

F= Constante equivalente a 0.05 (1 D.O.) = 50 µg de ADN

Factor de dilución: Equivalente a 1:250 µl.

El criterio de pureza de fenol (lectura a 240 nm) y proteínas (lectura a 280 nm), se obtuvo calculando el cociente entre estas lecturas y la lectura a 260 nm

(DNA); el cociente por encima de 1.6 se considera adecuado para estudio. La integridad del ADN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% a 100V por 30 minutos. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador con luz UV. La integridad del DNA se consideró como óptima cuando se observa una banda nítida de alto peso molecular (>23 kb del marcador de pesos moleculares fago λ /HindIII. **Figura 8**).

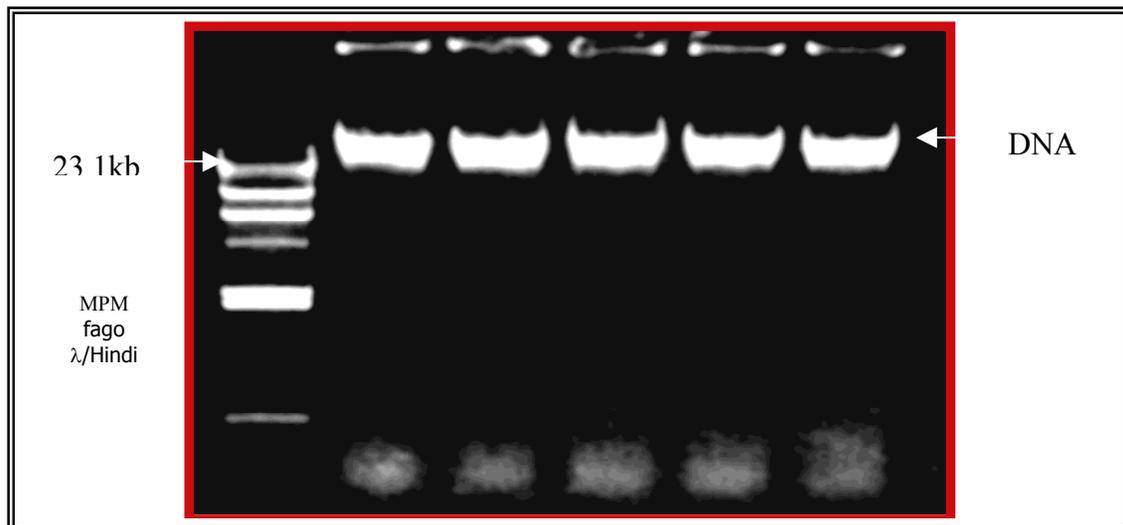


Figura 8. Integridad del DNA obtenido. El DNA se separó en geles de agarosa al 0.7%. Después de su tinción con bromuro de etidio, se apreció una banda nítida de alto peso molecular que nos revela la presencia de un DNA de adecuada integridad.

5.6 SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES F Y R.

Los oligonucleótidos se prepararon utilizando el método de fosforoamidita en un oligosintetizador (Pharmacia) y se purifican en columnas de Sephadex G-25. La secuencia de los oligonucleótidos para amplificar los tres polimorfismos (pERT87.8/*TaqI*, pERT87.15/*XmnI*, MP1P) y el tamaño de los productos respectivos se muestran a continuación:

RFLPs¹⁴⁹

pERT87.8/ <i>TaqI</i>	F: GTCAGTTGGTCAGTAAAAGCC R: CAGATCAGTCGACCAATTAACCACAGCAG	A1: 145pb A2: 71 / 74pb
--------------------------	--	----------------------------

pERT87.15/ <i>XmnI</i>	F: GACTGGAGCAAGGGTCGCC R: CTGATGAACAATTTCCCTTCATTCCAG	A1: 740pb A2: 520 / 220pb
---------------------------	--	------------------------------

VNTR¹⁵⁴

MP1P	F: ATGATCAGAGTGAGTAATCGGTTGG R: ATATCGATCTAGCAGCAGGAAGCTGAATG	A1: 60pb A2: 56pb
------	--	----------------------

5.7 DETECCIÓN DE PORTADORAS POR ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

Todos los integrantes de las 150 familias, fueron sometidos a análisis de los tres marcadores polimórficos intragénicos del gen DMD: pERT87.8/*TaqI* (intrón 13, tipo RFLP), pERT87.15/*XmnI* (intrón 17, tipo RFLP) y MP1P (región 3' no traducible, tipo VNTR bialélico) ampliamente utilizados para consejo genético en otras poblaciones. El análisis se realizó por PCR con posterior restricción con la endonucleasa respectiva, a excepción del marcador MP1P. Se obtuvieron las respectivas frecuencias alélicas, se integraron 9 haplotipos posibles y se indagó

sobre fenómenos de recombinación en la descendencia, la segregación de los alelos DMD mutados y/o de riesgo en las familias (El alelo de riesgo es el que porta el paciente afectado de DMD/DMB), así como su utilidad para brindar asesoramiento genético.

5.8 ANÁLISIS DE LOS MARCADORES pERT87.8/*TaqI*, pERT87.15/*XmnI* (RFLP´S) y MP1P (VNTR).

La amplificación de estos sitios polimórficos se llevo acabo mezclando 100-250 ng de ADN en una solución con amortiguador para el fragmento Stoffel® (Applied Biosystems, Foster City, CA) de la *Taq* polimerasa (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 2.0 UI de AmpliTaq fragmento Stoffel®, 0.1µM de cada oligonucleótido iniciador, 150µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 5% de DMSO (únicamente para *XmnI*), en un volumen de reacción final de 50 µl.

En el caso de pERT87.8/*TaqI* y MP1P, la reacción se lleva acabo bajo las siguientes condiciones: se inicia con una desnaturalización a 94 °C por 5 min., seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 50 seg, alineación a 55 °C por 50 seg. y extensión a 70°C por 3 min. y una elongación final a 70°C por 5 min. Para pERT87.15/*XmnI*, son 28 ciclos bajo las mismas condiciones exceptuando la temperatura de extensión que fue a 68°C. Para verificar la amplificación de pERT87.8/*TaqI* y pERT87.15/*XmnI*, 15µl del producto se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 3% a 100 Volts por 20 min, con 100 µl (100µg/100ml) de bromuro de etidio. Los productos de PCR se visualizaron y se

fotografiaron en un transiluminador con luz U.V con película Polaroid ISO 667 instantánea (**figura 9**).

La posterior restricción se llevó a cabo mezclando el amplificado de pERT87.8/*TaqI* con 3 UI de *TaqI* o 12 UI de *XmnI* para pERT87.15/*XmnI* a 65°C y 37°C respectivamente, durante toda la noche (la enzima *TaqI* reconoce y actúa sobre la secuencia 5´ T´CGA 3´, en tanto que *XmnI* reconoce 5´GAANN´NNTTC 3´, donde N es cualquier base). Los productos de restricción de *TaqI* y *XmnI*, se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 3% a 120V 20 minutos, con 100 µl (100µg/100ml) de bromuro de etidio (**figura 9**).

La interpretación de los alelos MP1P se realizó mediante electroforesis (120V / 45 min.) en geles de poliacrilamida al 9% (C.L. 3.3%) para posteriormente ser teñidos en una solución acuosa de bromuro de etidio (100µg/100ml) por 10 minutos, quitándose el exceso de bromuro de etidio por inmersión del gel en agua bidestilada, visualizados y fotografiados bajo luz UV (**figura 9**). En todas las reacciones de amplificación/restricción se corrieron en forma paralela muestras con genotipos conocidos (controles) para cada una de las combinaciones posibles de RFLPs y VNTR.

5.9 ESTADÍSTICA

Se utilizó la prueba de la Homogeneidad de la Chi Cuadrada (χ^2), mediante el programa de cómputo estadístico NCSS[®] (2001), para indagar sobre la homogeneidad o similitudes en las frecuencias alélicas y haplotipos de los marcadores utilizados en el estudio entre sí y con respecto a otros grupos étnicos.

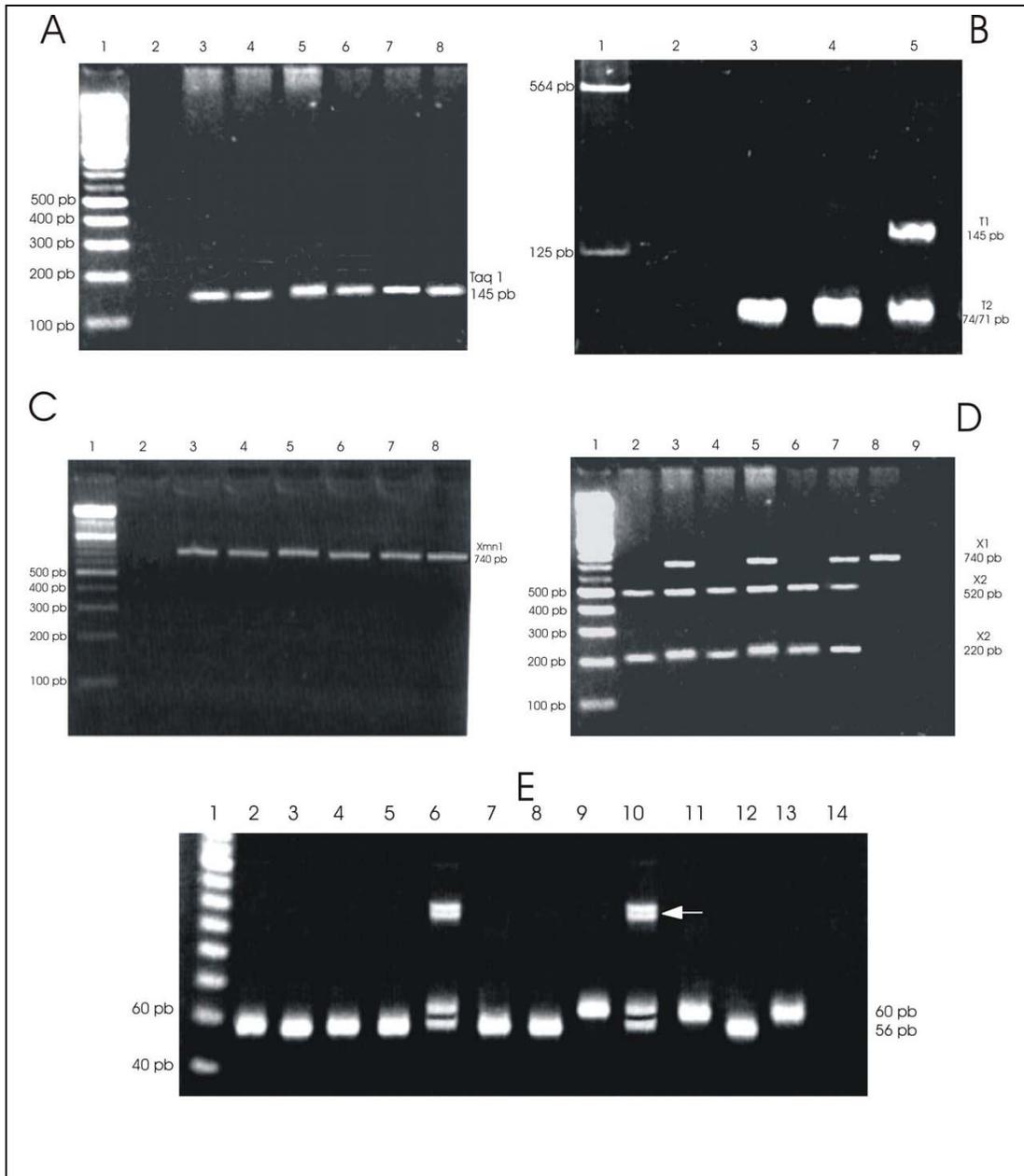


Figura 9. Amplificación y restricción de los polimorfismos analizados. **A.** Amplificación de pERT87.8/*TaqI*. Carril 1 marcador de pesos moleculares, carril 2 control negativo, carril 3-8 productos de amplificación. **B.** Restricción de pERT87.8/*TaqI*. Carril 1 marcador de pesos moleculares, carril 2 control negativo, carril 3 hombre hemicigoto, carril 4 mujer homocigota, carril 5 mujer heterocigota. **C.** Amplificación de pERT87.15/*XmnI*. Carril 1 marcador de pesos moleculares, carril 2 control negativo, carril 3-8 productos de amplificación. **D.** Restricción de pERT87.15/*XmnI*. Carril 1 marcador de pesos moleculares, carril 2 hombre hemicigoto, carril 3 mujer heterocigota, carril 4 mujer homocigota, carril 5 mujer heterocigota, carril 6 hombre hemicigoto, carril 7 mujer heterocigota, carril 8 mujer homocigota, carril 9 control negativo. **E.** Amplificación de *MPIP*. Carril 1 marcador de pesos moleculares. Carril 2-5 mujeres homocigotas, carril 6 mujer heterocigota, carril 7-9 hombres hemicigotos, carril 10 mujer heterocigota, carril 11 mujer homocigota, carril 12-13 hombre hemicigoto, carril 14 control negativo. En los carriles 5 y 10 se observan (a nivel de las 130 pb aproximadamente) “heteroduplex”, señalados con una flecha, siendo “artefactos” ocasionales de la técnica.

6. RESULTADOS

6.1 FRECUENCIAS ALÉLICAS

Se examinaron un total de 328 alelos, correspondientes a 150 madres de los casos índice y a 28 padres, ya que son individuos no emparentados y por tanto útiles para obtener las frecuencias alélicas de estos polimorfismos en nuestra población. Cabe mencionar que por convención se denomina alelo 1 (T1 y X1) al que carece de sitio de corte para la enzima de restricción (*TaqI* o *XmnI*) y alelo 2 (T2 y X2) al que sí lo tiene. En cuanto a *MP1P* se le denomina alelo plus al de 60 pb y minus al de 56 pb. La prueba de la X^2 en este apartado se utilizó con 1 grado de libertad (g.l) y una $P < 0.05$ (valor de tabla 3.841).

Las frecuencias alélicas para el polimorfismo pERT87.8/*TaqI* (intrón 13) fueron de 0.4177 (n=137) para T1 y 0.5762 (n=189) para T2 (**figura 10**), documentándose 2 madres con delección del intrón al no amplificar uno de los alelos, lo que representa el 0.006 de la frecuencia. Al comparar las frecuencias obtenidas en nuestra población mexicana analizada con las reportadas en otras poblaciones (**figura 11**)^{133,154,155,156,157}, se observa una similitud estadísticamente significativa con las frecuencias alélicas reportadas para la población hindú (0.421(n=24) para T1 y 0.579(n=33) para T2) con una X^2 de 0.000130.

En cuanto al polimorfismo pERT87.15/*XmnI* (intrón 17), se encontró una frecuencia alélica de 0.4451 (n=146) para X1 y de 0.5488 (n=180) para X2 (**figura 10**), encontrando a 2 madres con delección del intrón, lo que representa el

0.006 en la frecuencia. Al comparar con otros grupos étnicos reportados (**figura 12**)^{133,154,155,157}, no se encontró similitud estadísticamente significativa, siendo las frecuencias alélicas en la población japonesa las que más se asemejan, con una X^2 de 4.4045 (0.55 n=93 para X1 y 0.45 n=77 para X2).

En el caso del marcador MP1P (región 3' no traducible) las frecuencias alélicas obtenidas fueron de 0.2580 (n=64) para el alelo Plus y 0.7419 (n=184) para el alelo Minus (**figura 10**), al buscar similitudes con otros reportes (**Figura 13**)^{155,158}, se obtuvo una X^2 de 3.3476 con la población inglesa (0.12 n=5 alelo Plus y 0.88 n=35 alelo Minus), con lo que se concluye que existe una similitud en las frecuencias alélicas de ambas poblaciones. Un reporte en caucásicos revela frecuencias alélicas totalmente distintas con 0.68 para el alelo Plus y 0.32 para el alelo Minus con una X^2 de 35.459351.

En cuanto a las frecuencias alélicas de los casos índice estas fueron de 0.38 (n=57) para T1 y 0.553 (n=83) para T2, encontrando el 0.066 de los alelos deletados (n=10). En cuanto a XI, estas fueron de 0.4133 (n=62) y 0.5333 (n=80) para X2 encontrando deletado el alelo en el 0.0533 de los casos (n=8). Por último las frecuencias alélicas para el alelo plus fueron de 0.2033 (n=118) y para el minus de 0.788 (n=24), documentándose un paciente con delección del marcador (0.066).

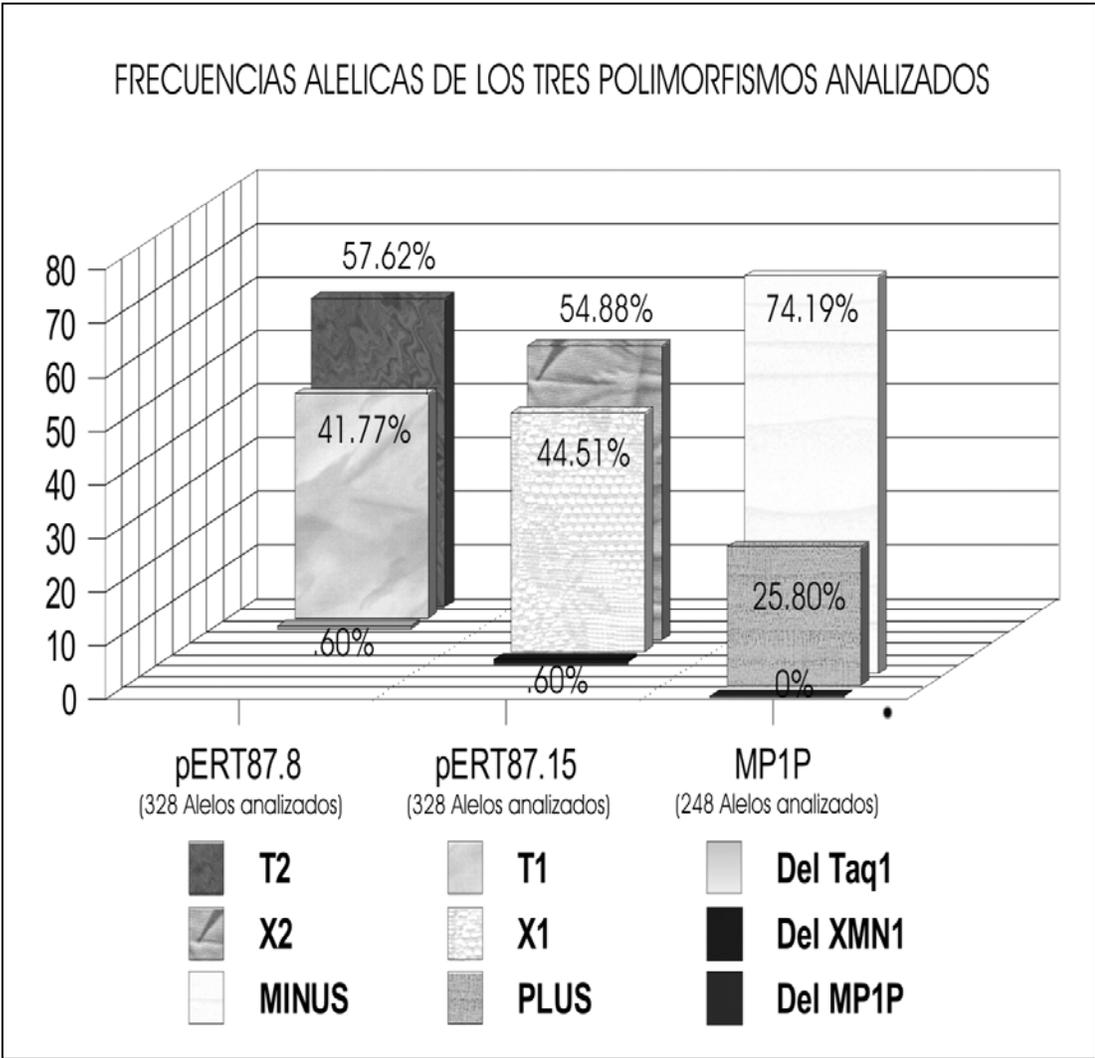


Figura 10. Frecuencias alélicas de los tres polimorfismos analizados. PERT87.8/*TaqI*, pERT87.15/*XmnI* y MP1P. Los RFLPs muestran frecuencias alélicas semejantes entre sí, en tanto que en el VNTR predominó el alelo minús.

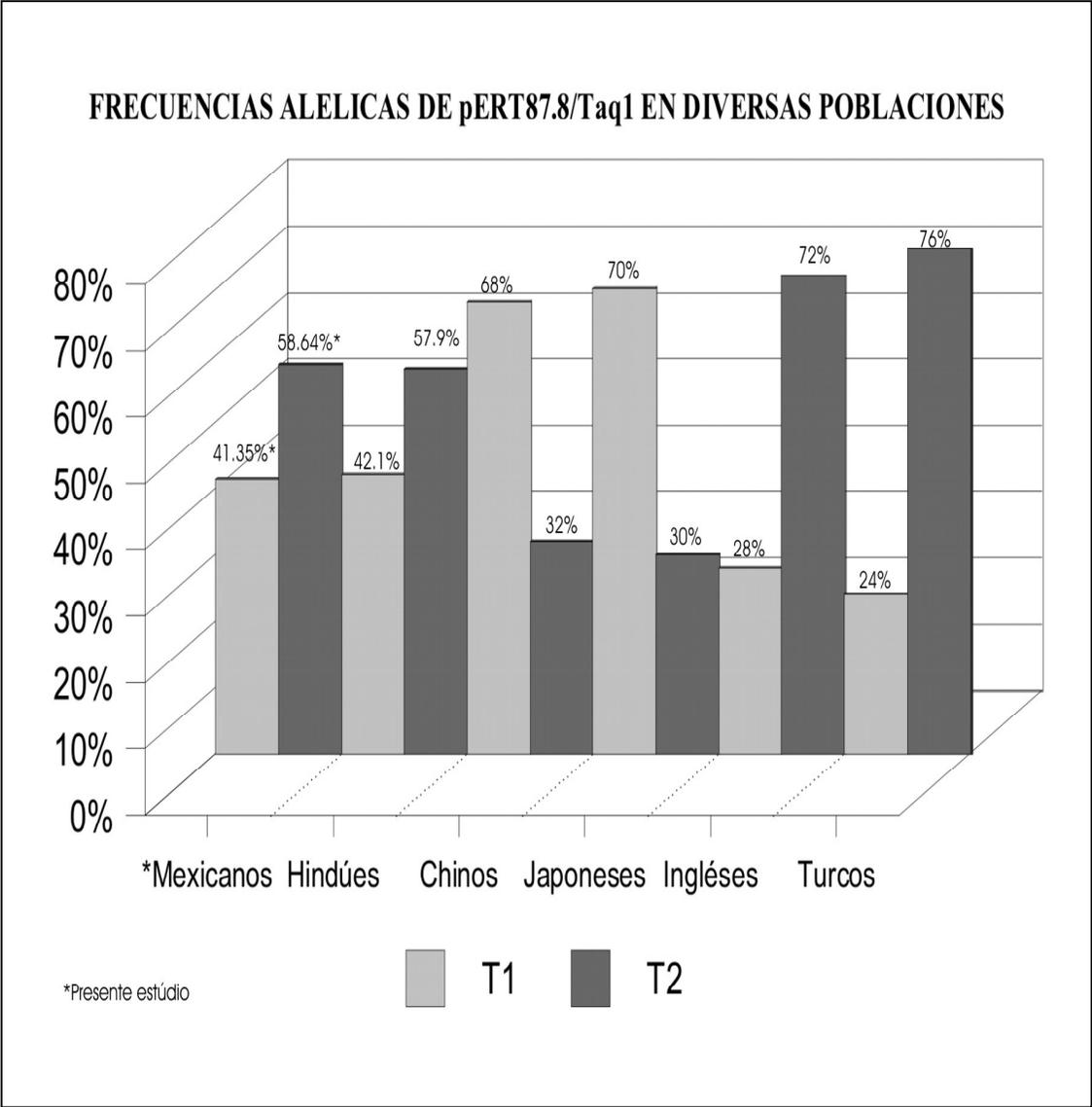


Figura 11. Frecuencias alélicas del polimorfismo pERT87.8/Taq1 en diversas poblaciones. Es de notar la similitud existente entre las frecuencias alélicas de la población hindú y la mexicana.

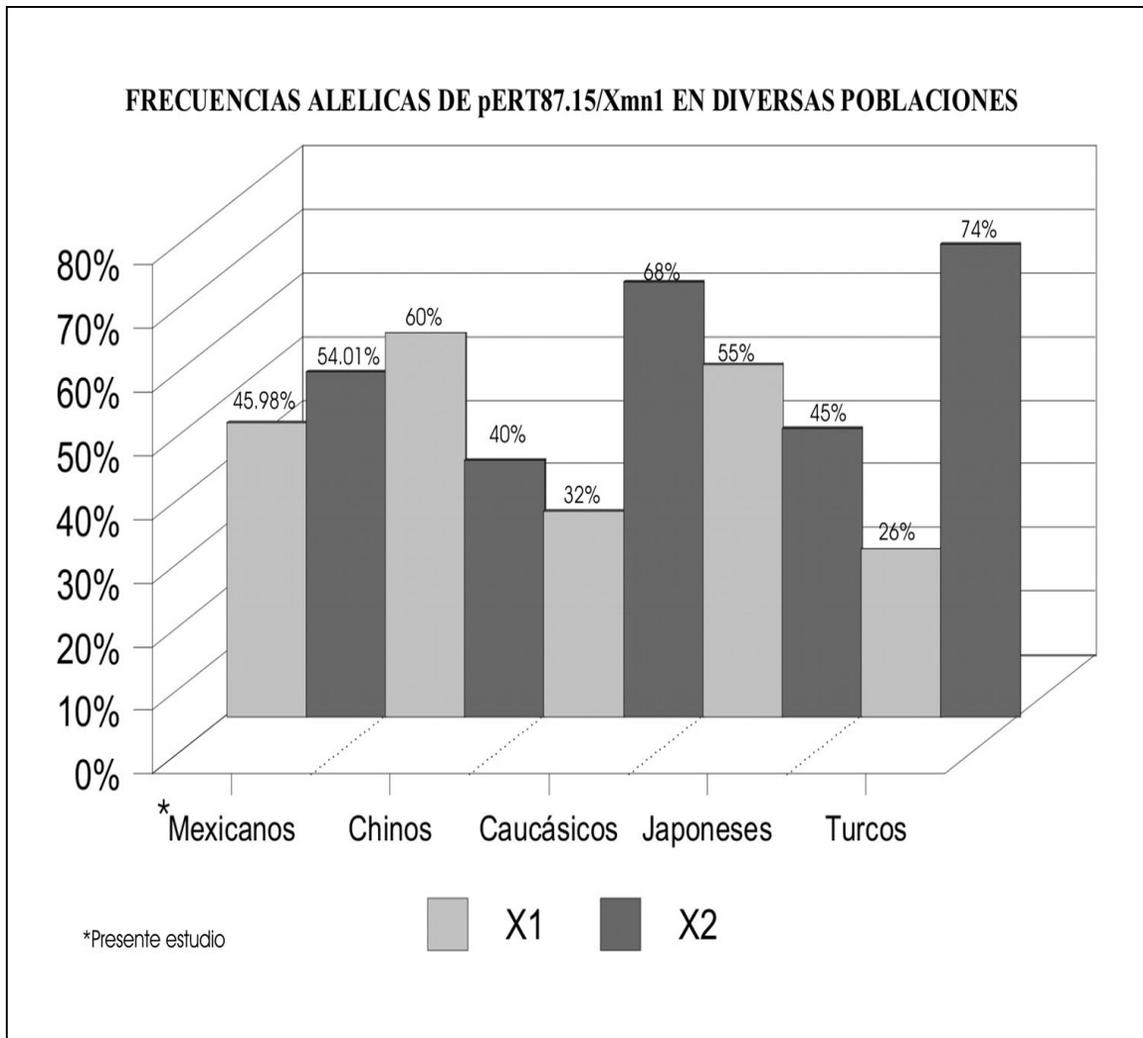


Figura 12. Frecuencias alélicas del polimorfismo pERT87.15/Xmn1 en diversas poblaciones. Las frecuencias obtenidas en la población mexicana difieren significativamente de las reportadas para otros grupos étnicos.

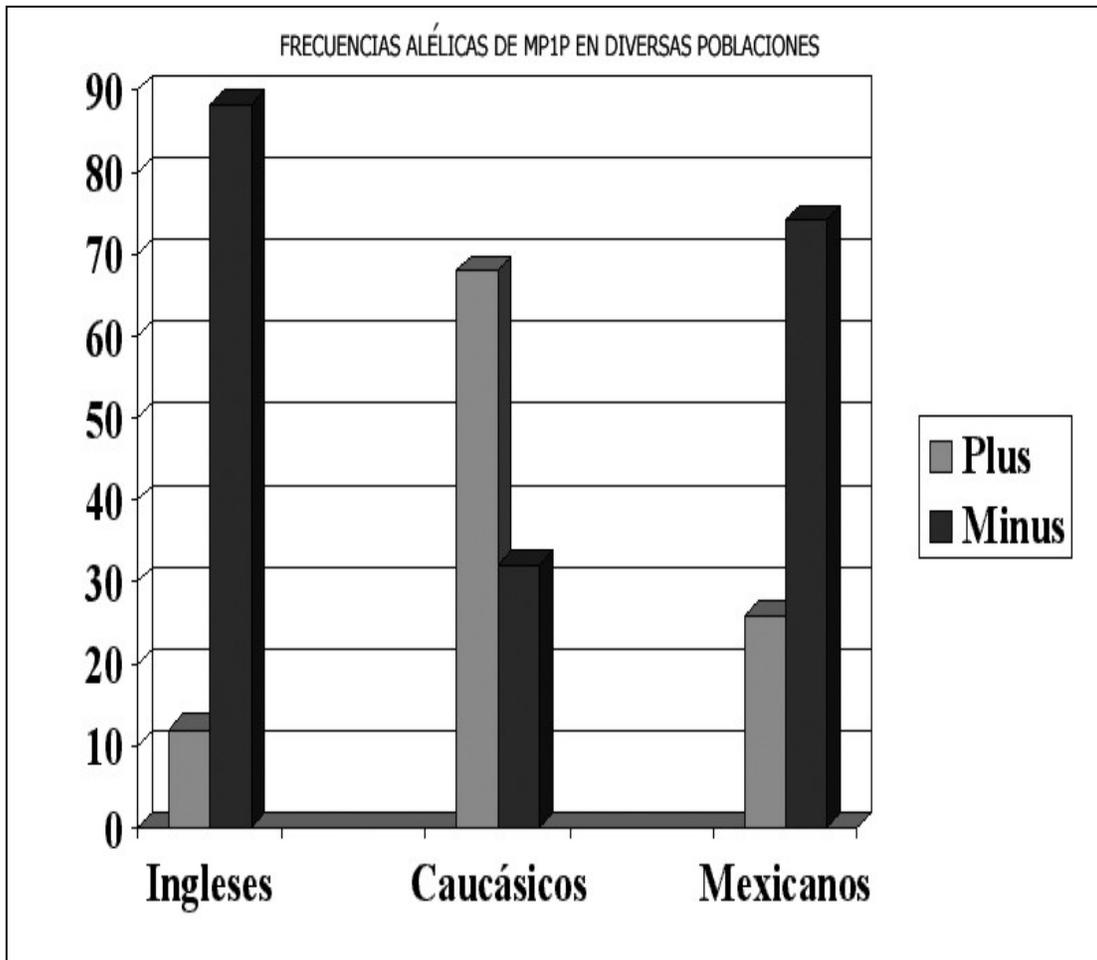


Figura 13. Frecuencias alélicas de MP1P en diversas poblaciones, es de notar una cierta similitud en las frecuencias entre la población inglesa y mexicana.

6.2 ÍNDICE DE HETEROCIGOCIDAD EN MADRES

Para el marcador pERT87.8/*TaqI*, se encontró un índice de heterocigocidad (informatividad) del 49.33% (74 de 150 madres), en cuanto a PERT87.15/*XmnI* la informatividad fue del 54% (81 de 150 madres), siendo éste el marcador más informativo de los tres estudiados en esta población mexicana, en tanto que el marcador menos informativo fue el MP1P con únicamente 36.20% de madres heterocigotas (42 de 116 madres). Cabe mencionar que 2 madres presentaron delección heterocigota de pERT87.8/*TaqI* y pERT87.15/*XmnI*, puesto en evidencia por la no amplificación de dichos alelos, correspondiendo al 1.33% de las población analizada (**Figura 14**).

El índice de heterocigocidad global, esto es madres heterocigotas para al menos un marcador fue del 84% (n=126) madres (**Figura 15**).

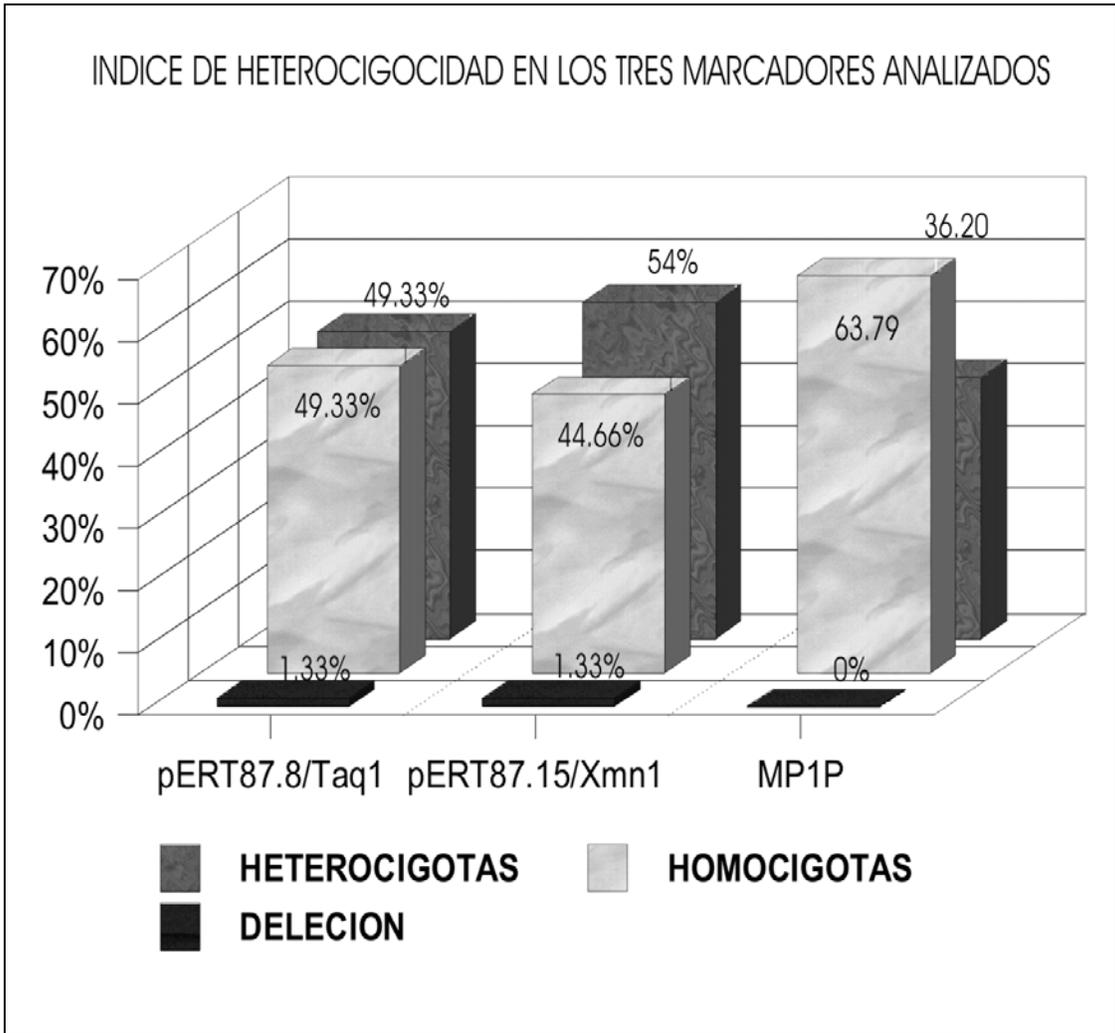


Figura 14. Índice de heterocigocidad en los tres polimorfismos analizados, los RFLPs obtuvieron índices cercanos al 50%, situación esperada para marcadores bialélicos, en tanto que MP1P obtuvo un bajo índice de heterocigocidad.

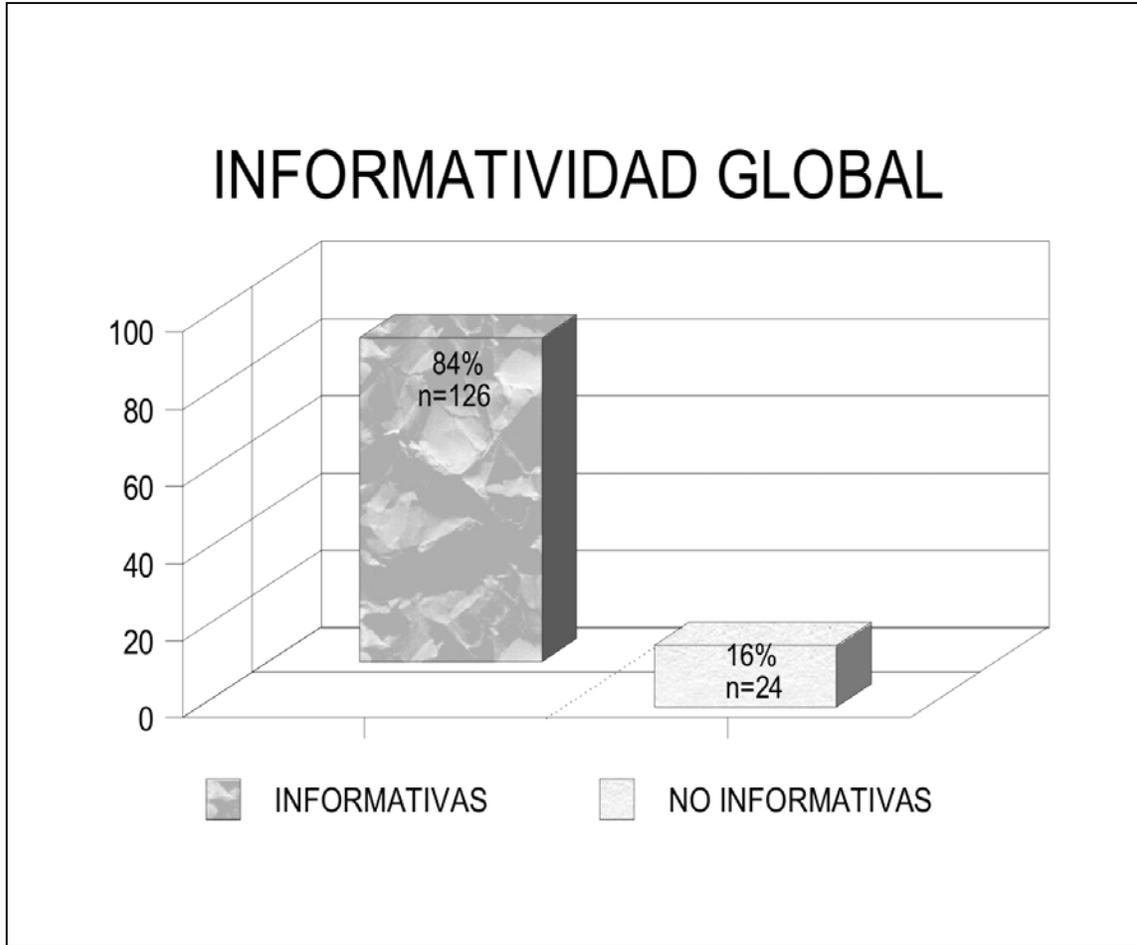


Figura 15. Informatividad global. El número de madres heterocigotas para al menos un marcador fue bastante alto y superior a otros reportes que utilizan una cantidad similar de polimorfismos¹⁶⁰.

6.3 ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

Los haplotipos resultantes se denominaron de la siguiente manera de acuerdo a las 8 posibles combinaciones:

- A. T1, X1, PLUS.
- B. T1, X1, MINUS.
- C. T1, X2, PLUS.
- D. T1, X2, MINUS.
- E. T2, X1, PLUS.
- F. T2, X1, MINUS.
- G. T2, X2, PLUS.
- H. T2, X2, MINUS.

En el 6.01% del total de los miembros de las familias no fue posible determinar el haplotipo, ya sea por delección de uno o más marcadores o por no poder definirlos con certeza en las hijas o madres, representando las delecciones el 3.0% de los casos.

La frecuencia global de los 8 haplotipos en madres y casos índice se muestra en la **figura 16 y 17**. Los resultados nos muestran que el haplotipo más frecuente fue el H, tanto en madres (28.37%) como en los casos índice (27.86%), en tanto que el haplotipo menos frecuente en madres y casos índice fue el E con 3.15% y 1.74% respectivamente.

Se buscó la presencia de diferencias entre los haplotipos de los pacientes DMD y DMB encontrándose una X^2 de 4.77 (7 g.l y $p < 0.05$). Dicho resultado revela una homogeneidad de haplotipos entre ambas poblaciones (**figura 17**).

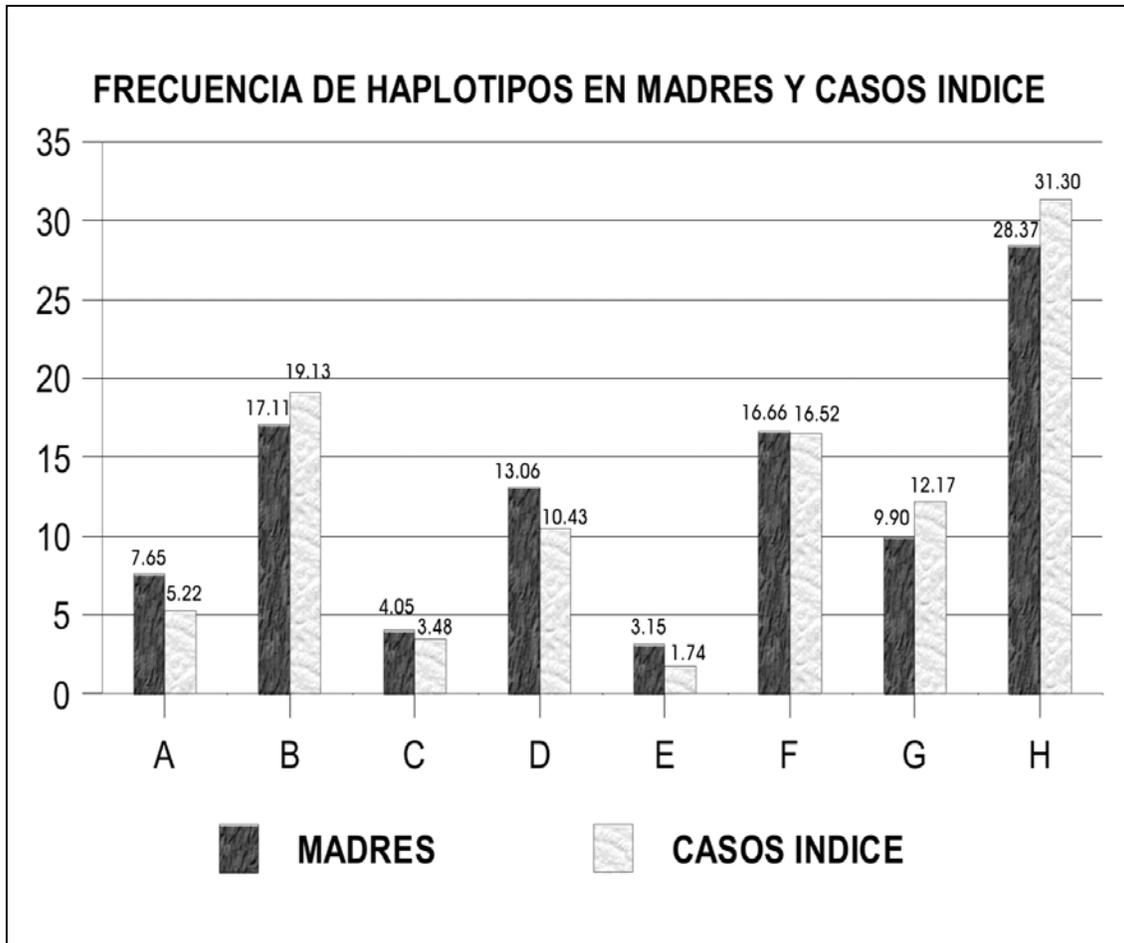


Figura 16. Frecuencia de haplotipos en madres y casos índice en porcentaje. El haplotipo más frecuente fue el H, en tanto que el menos frecuente fue el E. Las frecuencias de ambos grupos son muy similares, por lo que no se pone de manifiesto la presencia de algún haplotipo en particular en los casos índice.

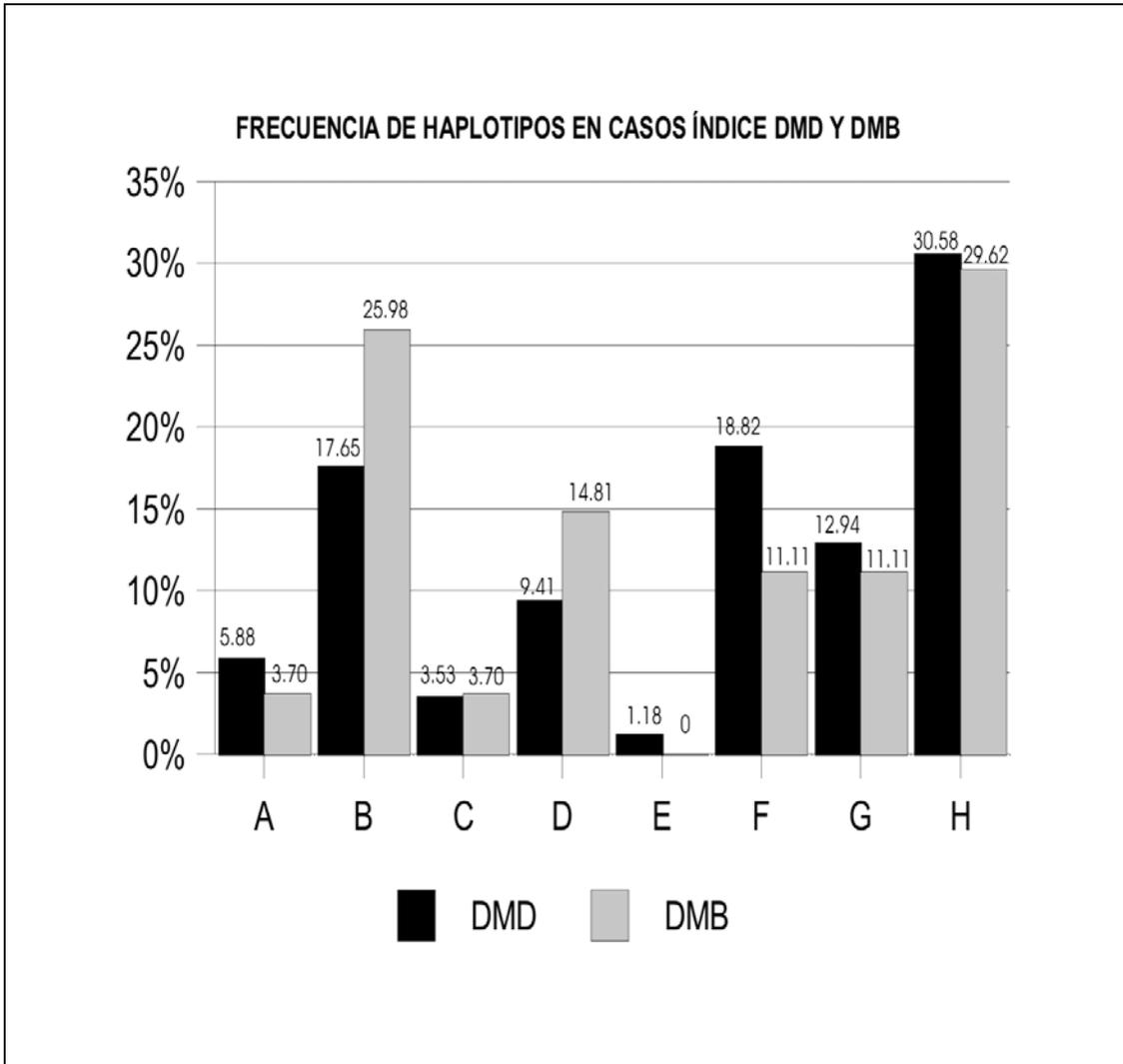


Figura 17. Frecuencia de haplotipos en casos índice DMD y DMB. El análisis global de las frecuencias revela que son estadísticamente similares.

Otro punto que se analizó fue la asociación de haplotipos con la mutación presente en los casos índice (51 pacientes con delección y 61 sin delección de exones) de acuerdo al estudio previo de Alcántara y cols⁵⁴, por medio de la X^2 se observa una semejanza en los haplotipos de ambas muestras ($X^2 = 7.8796$, 7 gl, $p < 0.05$), sin embargo se aprecian diferencias en el haplotipo A (delección 1.96%, no delección 8.20%), D (delección 5.88%, no delección 14.75%) y F (delección 23.53%, no delección 11.48%).

6.4 ÍNDICE DE RECOMBINACIÓN INTRAGÉNICA

El análisis de los haplotipos permitió identificar 9 eventos de recombinación intragénica en la región pERT87 y MP1P (6 en la región 5' y 3 en la región 3'), en un total de 308 meiosis analizadas (pertenecientes a 150 casos índice, 106 hermanas, 46 hermanos y 10 sobrinos), siendo la frecuencia de recombinación observada del 2.92%, resultando menor a la esperada de hasta el 12%¹⁵³, dos de estos eventos se esquematizan en la **figuras 18 y 19**. Cuatro de estas familias presentan historia familiar de DMD/B, repercutiendo negativamente para el asesoramiento genético en ellas ya que no se logró definir la segregación del alelo mutado en las hijas (3 familias) ni el origen de dichos haplotipos en las hijas debido a la ausencia de muestra del padre (1 familia). Aunado a esta situación, en 7 de las 9 familias no se ha logrado caracterizar la mutación responsable en los casos índice, por lo que el análisis de ligamiento constituye la única herramienta disponible para evidenciar la segregación del alelo de riesgo en la descendencia.

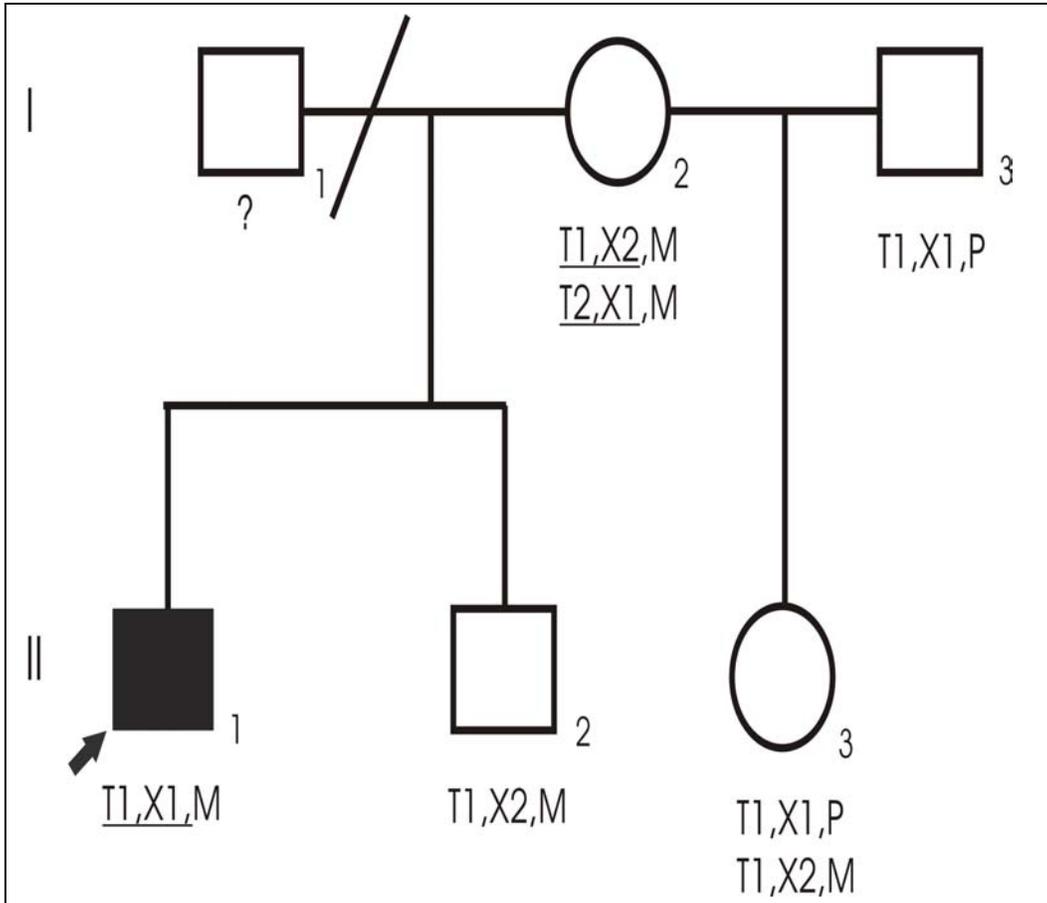


Figura 18. Evento de recombinación en el caso índice en familia sin historia de la enfermedad. En ésta familia no se cuenta con muestra del padre de los dos varones (II₁ y II₂), sin embargo se dispone de DNA del padre (I₃) de su media hermana (II₃), por lo que es posible determinar el haplotipo paterno y el materno heredado a ella, ya que comparte el haplotipo D con el medio hermano no afectado, con lo que evidencian los haplotipos maternos (D y F). Aún así se desconoce si la recombinación ocurrió en la región del intrón 13 o 17.

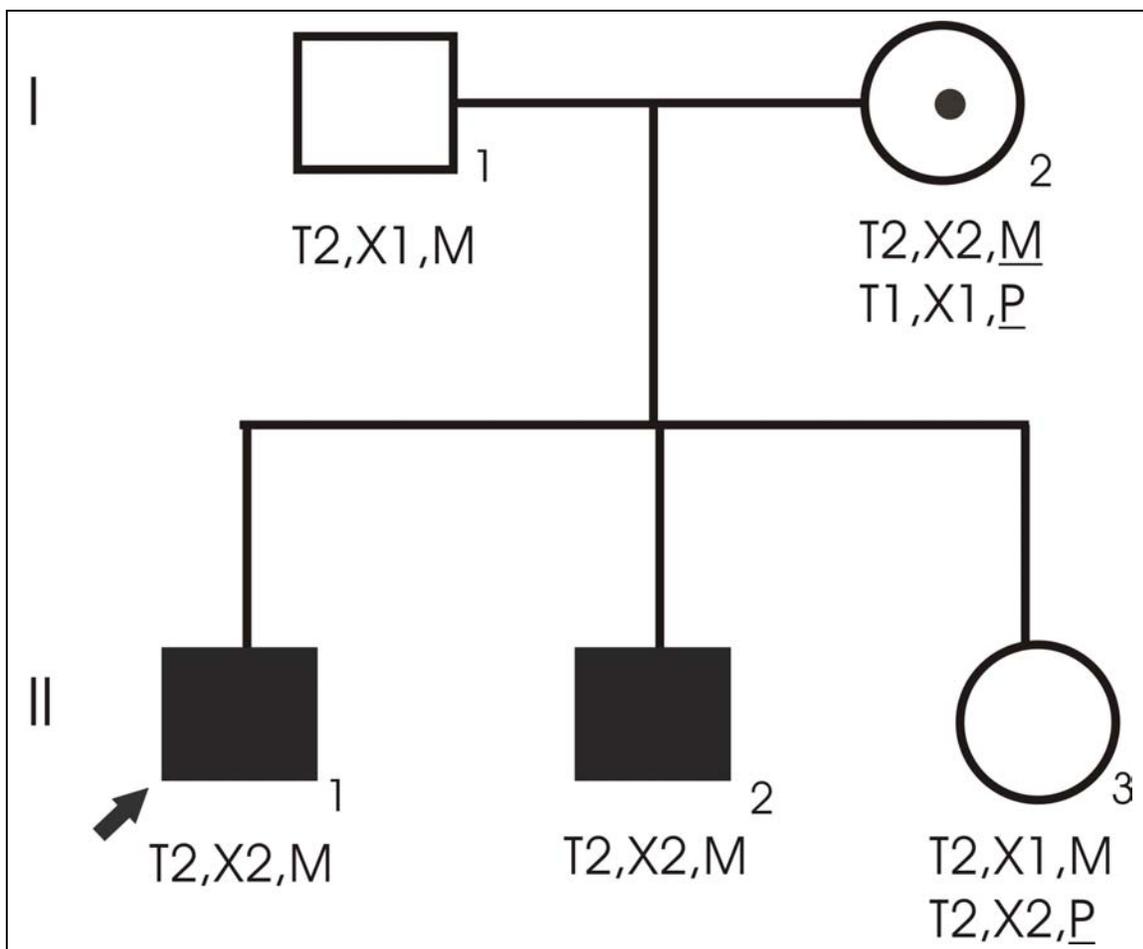


Figura 19. Evento de recombinación en la región 3' en una familia con antecedentes de la enfermedad, madre portadora y mutación no caracterizada. En esta familia la recombinación se presentó en la hija (II₃) en la que se observa la presencia del alelo paterno obligado (F), así como el alelo materno heredado (G) producto de la recombinación. En los hermanos (II₁ y II₂), ambos portadores de la distrofia se observa el alelo materno heredado (H). A pesar de que la hija heredó el alelo de riesgo, no es posible determinar por esta metodología si el mismo presenta la mutación debido al evento de recombinación y por lo tanto si ella es portadora o no de la enfermedad.

6.5 UTILIDAD DEL ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

6.5.1 Utilidad en el total de las familias participantes

El análisis de ligamiento utilizado como método único para detectar portadoras o documentar la segregación del alelo de riesgo en la descendencia, en el total de las familias participantes en este estudio (n=150), fue útil en el 22.66% de los casos (n=34), 18 por exclusión del alelo de riesgo y 16 por asignación del alelo de riesgo siendo 21 casos esporádicos y 13 familiares (**figuras 20, 21 y 22**), resultando no aplicable para detectar o excluir portadoras en el 46% de los casos (n=69) debido a la sola presencia del caso índice u otro hijo varón y no útil en el 16% (n=24) por ser las madres homocigotas para todos los marcadores, hubo 14 familias (9.33%) en las que debido a la igualdad de haplotipos entre madres e hijas y la carencia de muestra del padre, resultó imposible ubicar el haplotipo materno heredado a las hijas, revelándose con esto la importancia de la inclusión de la muestra del padre en este tipo de análisis. El porcentaje restante (6% n=9) en dónde se presentaron problemas para asignar haplotipos se debe a la presencia de deleciones en madres y las recombinaciones, previamente descritas.

Al iniciar este estudio, sabíamos de antemano que el análisis de ligamiento no iba a ser útil para asignar o excluir portadoras en las familias que únicamente cuentan con un hijo varón afectado, al menos no por el momento, por lo que al calcular la utilidad al considerar únicamente a las familias en las que la estructura de estas permitía aplicar el análisis de ligamiento (n=81), ésta resulta ser del

41.97% (n=34). Cabe recordar que en las familias con deleción caracterizada (n=75) la detección de portadoras se lleva acabo por medio de la técnica de la dosis génica.

6.5.2 Utilidad en familias sin deleción caracterizada

En las familias sin deleción caracterizada (n=75), en las que el análisis de ligamiento resulta ser su única opción, además de la historia familiar (árbol genealógico), la asignación del alelo en riesgo fue aplicable a 7 familias, en tanto que la exclusión fue útil en 10 familias, representando en conjunto el 22.66% (n=17) del total, en el 14.66% (n=11) de las familias la madre resultó homocigota para todos los marcadores, en el 8% (n=6) es necesaria la presencia del padre para identificar adecuadamente el alelo materno heredado a las hijas y en el 6.6% (n=5) la recombinación dificulta la asignación.

La utilidad al considerar a las familias en las que se puede utilizar el análisis de ligamiento por tener sujetos femeninos en la descendencia (n=39) resulta ser del 43.58% (n=17).

6.5.3 Utilidad en las familias con historia de la enfermedad y mutación no caracterizada

Existen 22 familias (dentro de las 75 sin mutación caracterizada) con historia familiar para la enfermedad además de 3 en las que la madre es considerada como portadora obligada sin tener antecedentes familiares, siendo útil

el análisis de ligamiento en ellas para asignar o excluir portadoras en 8 (32%), en 9 (36%) no es aplicable por carecer de sujetos femeninos en la descendencia o ADN de familiares, en 2 (8%) la recombinación dificulta la asignación, en 3 (12%) la madre es homocigota para todos los marcadores y por último en 3 (12%) es necesaria la presencia del padre para identificar adecuadamente al alelo materno heredado (**figuras 23 y 23**).

Al calcular la utilidad al considerar únicamente a las familias en las que es aplicable el análisis de ligamiento para asignar o excluir portadoras debido a la presencia de sujetos femeninos en la descendencia (n=16), esta resulta ser del 50% (n=8).

Una situación que pudiese conducir a errores en la asignación es la no paternidad. En 2 familias se detectó esta situación pese al carácter bialélico de los marcadores utilizados, al carecer del alelo obligado paterno. Sin embargo al identificar el evento, no alteró la asignación o exclusión del alelo de riesgo.

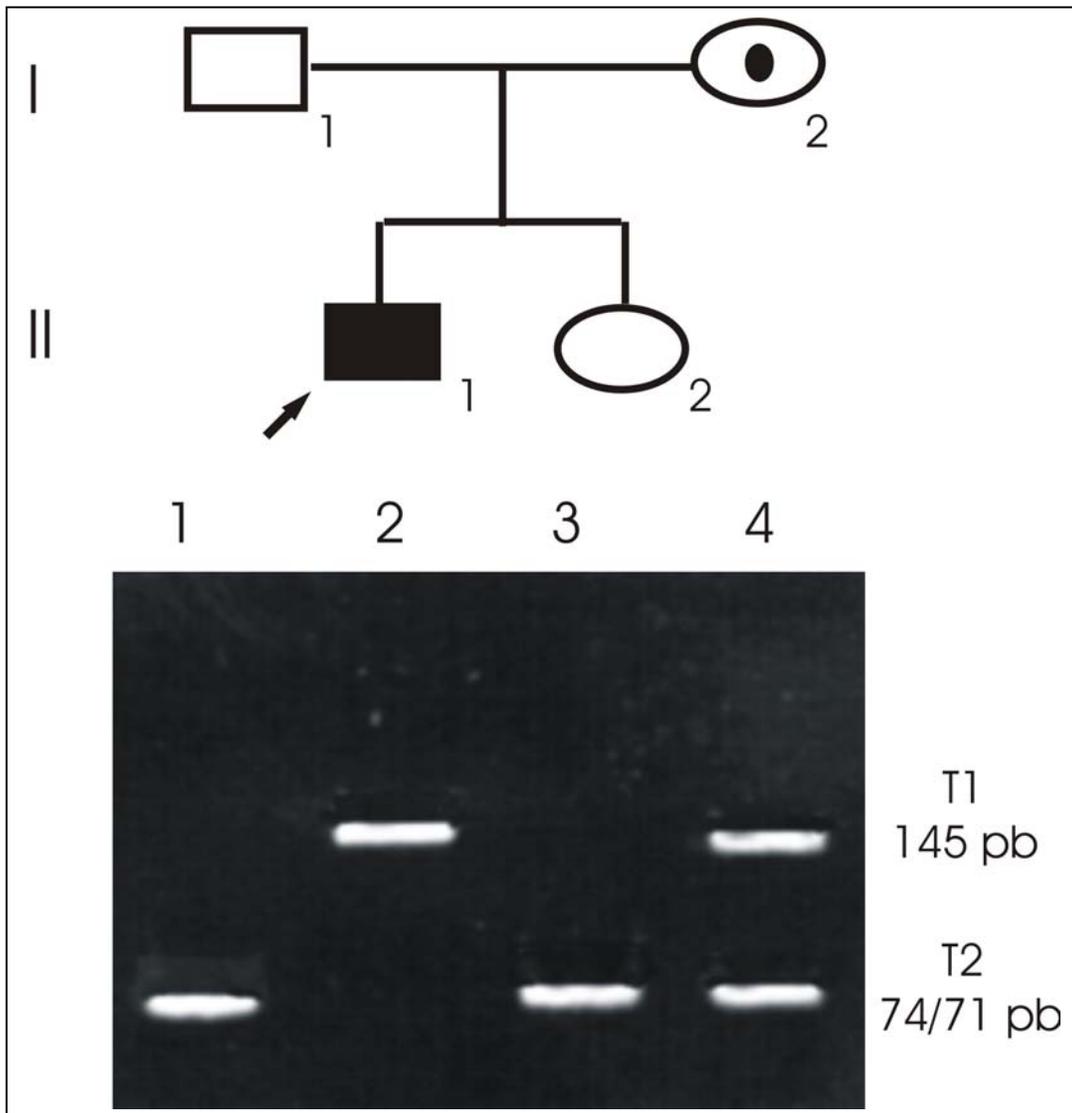


Fig.20. Exclusión del alelo mutado en la hermana del caso índice en una familia con antecedentes de la enfermedad y mutación no caracterizada utilizando pERT87.8/*TaqI*. La madre es heterocigota para el marcador (carril 4) y por lo tanto informativa, en esta familia se cuenta con muestra del padre (carril 1) que, resultó ser hemicigoto T2, el caso índice es hemicigoto T1 (carril 2), siendo este el alelo mutado, la hermana del caso índice es homocigota para el alelo T2 (carril 3), heredados del padre y la madre, descartándose en ella por lo tanto la presencia del alelo de riesgo.

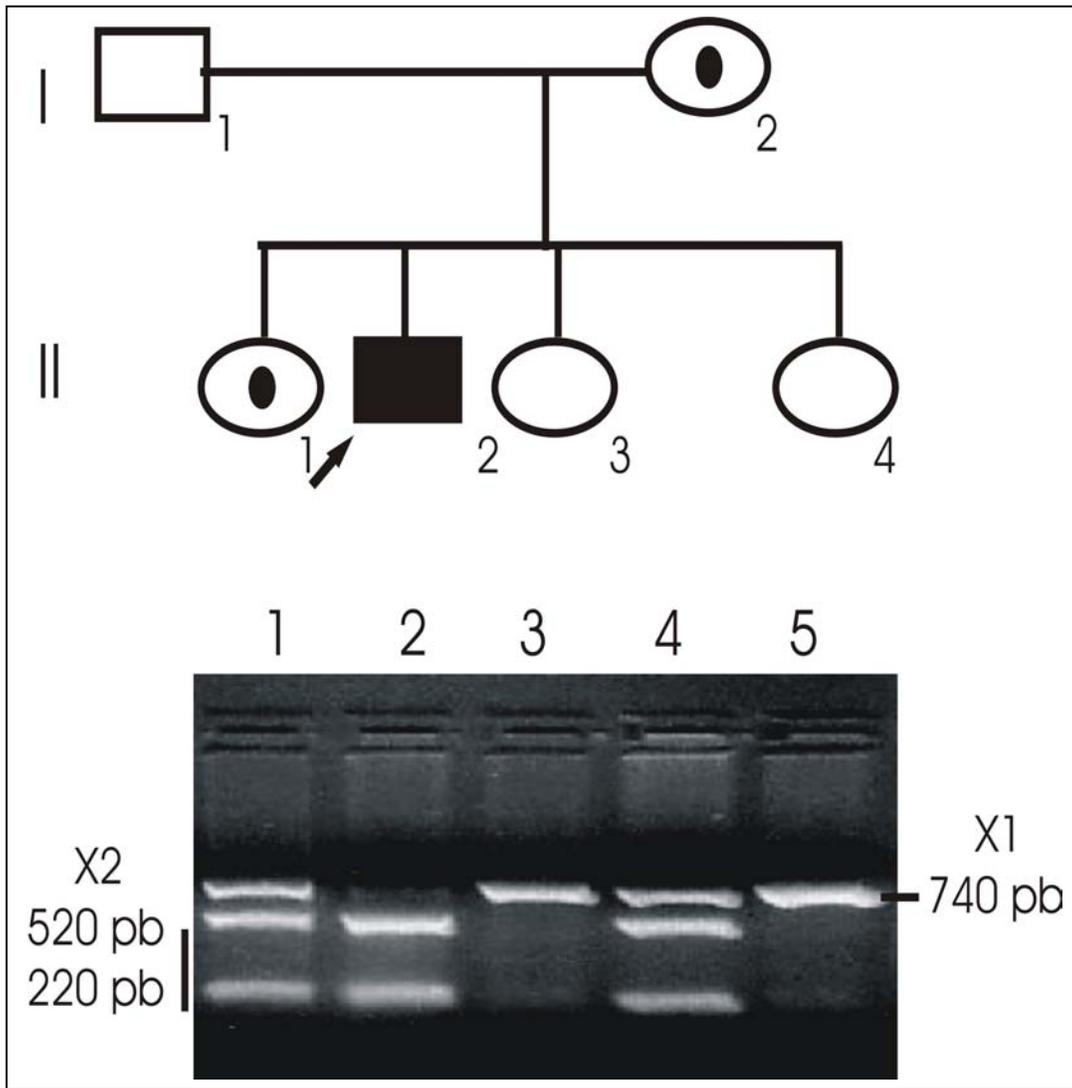


Figura 21. Asignación y exclusión del alelo mutado por medio de pERT87.15/*XmnI* en una familia sin mutación caracterizada y con antecedentes de la enfermedad. La madre es portadora obligada e informativa (carril 4). No se cuenta con muestra de DNA paterna aunque no resulta indispensable para identificar al alelo mutado. El caso índice es hemicígote X2 (carril 2), 2 de las hermanas son homocigotas X1 (carril 3 y 5), permitiéndonos identificar al alelo paterno indirectamente y el materno que no es el de riesgo sin embargo, la hermana restante (carril 1) es heterocigota, portando el alelo paterno obligado X1 y el materno X2 es el mismo que ostenta el caso índice, asignándosele por ende el carácter de portadora.

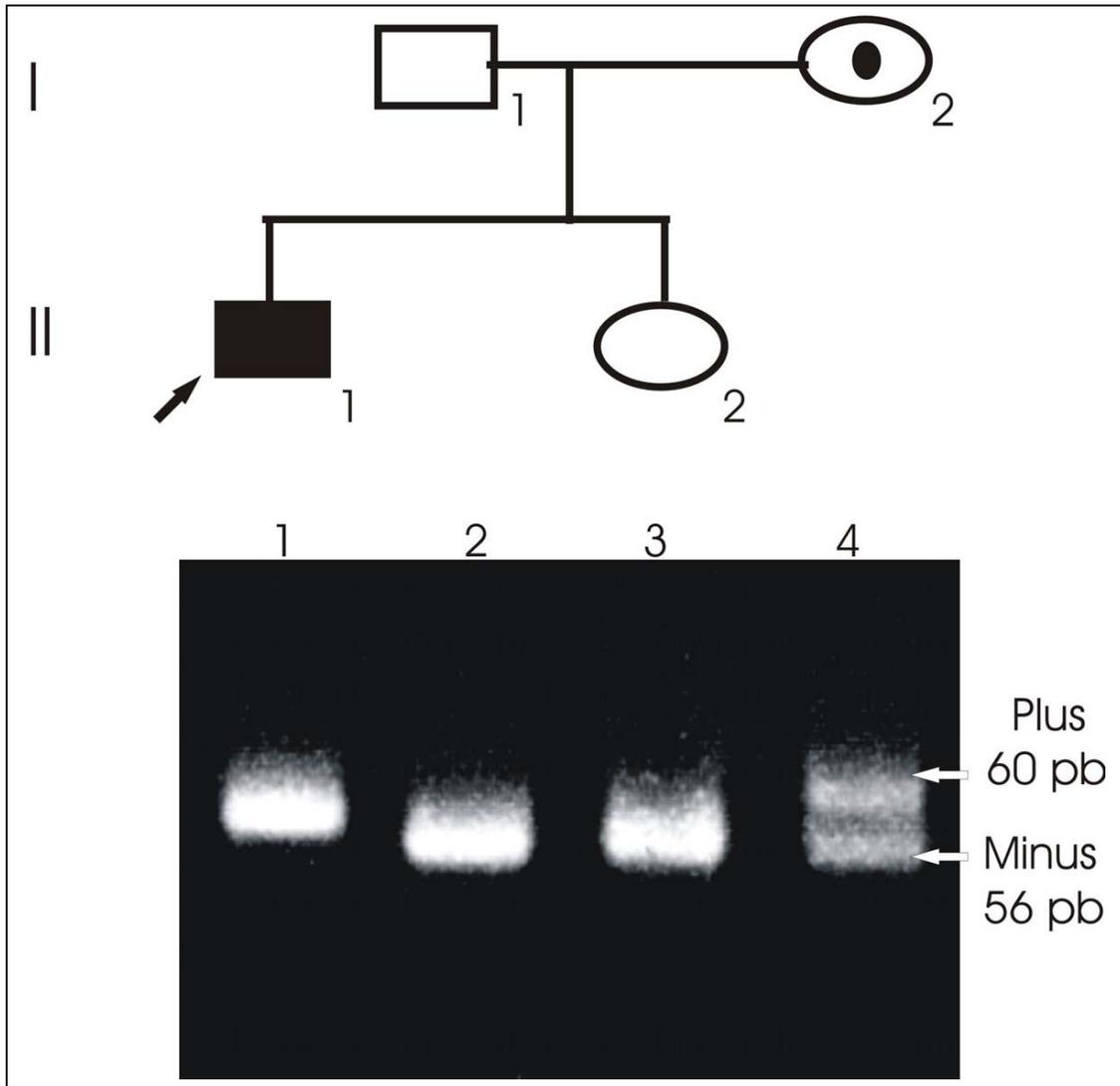


Fig. 22. Exclusión del alelo de riesgo en familia con antecedentes de la enfermedad utilizando el polimorfismo MP1P. Carril 1 caso índice hemicigoto Plus, carril 2 padre hemicigoto Mínus, carril 3 hija homocigota Mínus , descartándose por lo tanto su carácter de portadora, carril 4 madre heterocigota y por consiguiente informativa.

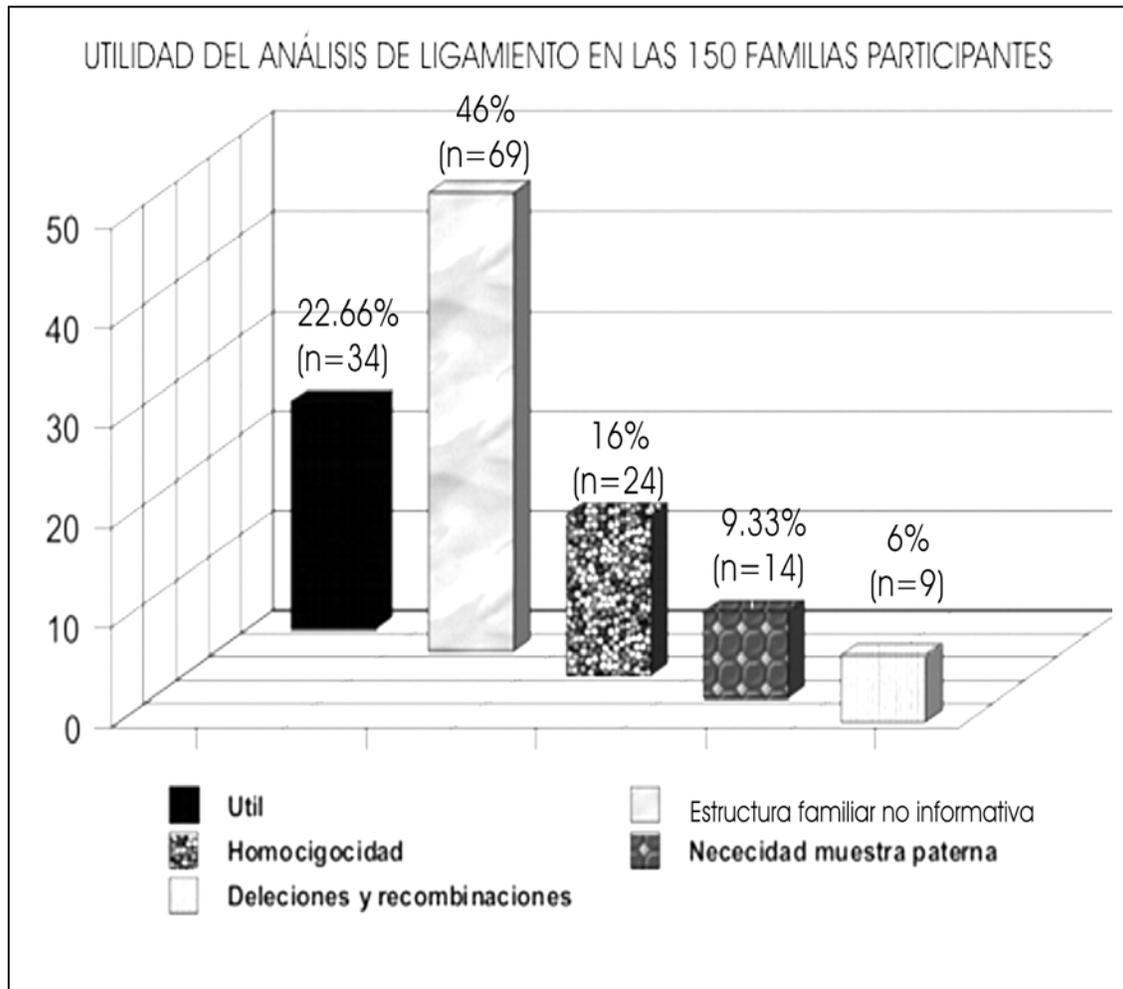


Figura 23. Utilidad del análisis de ligamiento en el total de las familias participantes en este estudio. El análisis de ligamiento fue útil en el 22.66% de las familias. En las restantes no fue útil debido a la no informatividad de la familia (46%), madres homocigotas para todos los marcadores (16%), ausencia de muestra paterna (9.33%) y eventos de recombinación y deleción(6%).

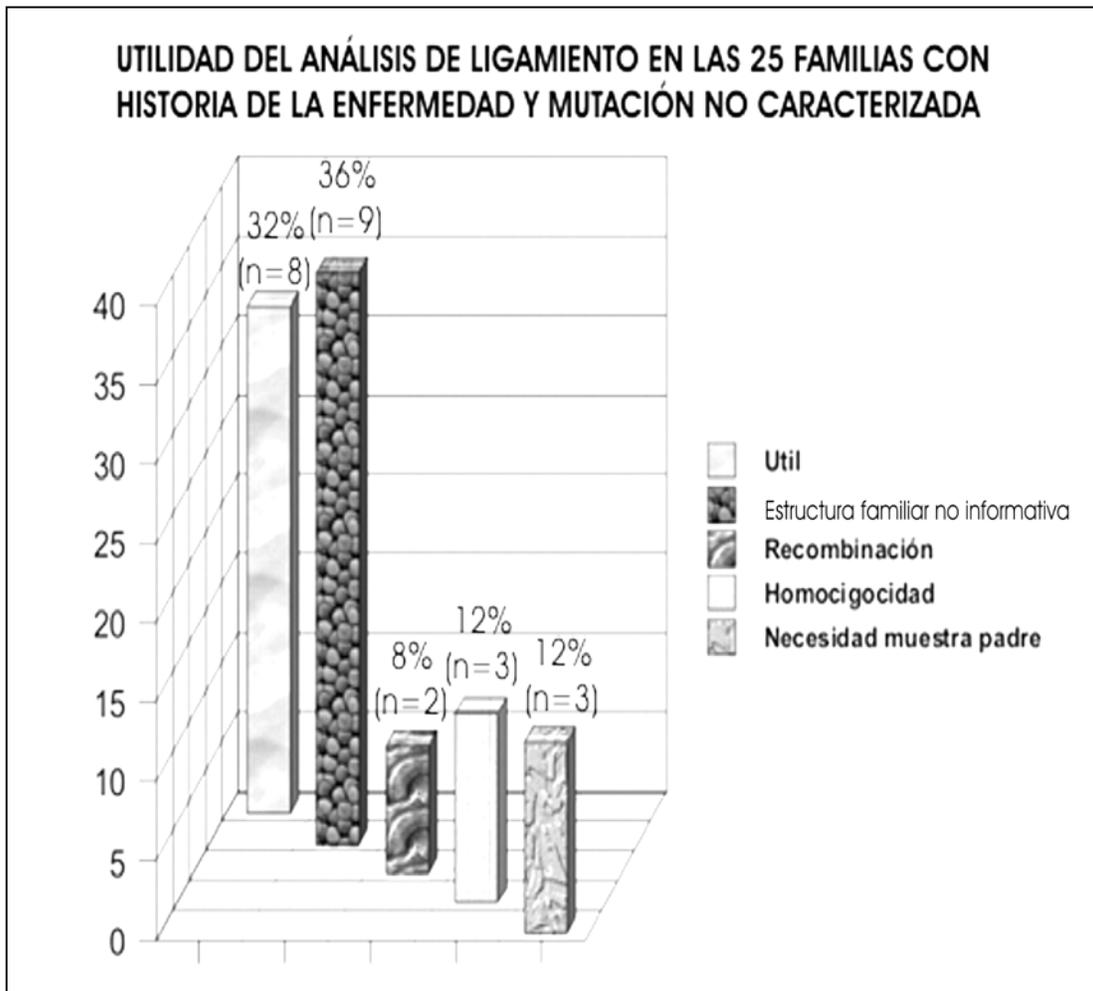


Figura 24. Utilidad del análisis de ligamiento en las 25 familias con historia de la enfermedad y mutación no caracterizada (3 de las madres son consideradas portadoras obligadas por tener 2 hijos afectados, sin tener antecedentes familiares). En este grupo de familias la utilidad fue del 32%, en tanto que el ligamiento no fue útil en el 36% de las familias debido a la mala estructura familiar, en el 8% de los casos debido a eventos de recombinación, en el 12% por ser las madres homocigotas para todos los marcadores y por último en el 12% restante por ausencia de muestra paterna.

7. DISCUSIÓN

Las DMD/B son enfermedades letales en las cuales no se dispone actualmente de un tratamiento curativo, aunque una serie de fármacos han sido estudiados aunque sin mayor éxito a largo plazo¹⁶¹. La terapia génica ha dado resultados esperanzadores en modelos celulares o animales de laboratorio¹⁶², sin embargo su aplicación en humanos aún se ve lejana^{163,164}. Dada la letalidad, frecuencia y carácter incurable de las DMD/DMB, los aspectos preventivos resultan imprescindibles en el abordaje de estas familias diagnosticando portadoras, realizando estudios prenatales y de preimplantación². El asesoramiento genético basado en métodos tradicionales, como son la CPK sérica o una biopsia muscular (método invasivo), brinda resultados inconsistentes, tal como lo han demostrado diferentes estudios^{24,104}.

La biología molecular ha tenido en las ultimas 2 décadas un impacto notable en el diagnóstico de las enfermedades monogénicas, siendo las DMD/DMB prototipos de este abordaje¹⁶⁵. El uso de la biología molecular en las DMD/DMB se basa actualmente en la búsqueda de deleciones en los varones afectados por medio del PCR múltiple, confirmándose el diagnóstico al encontrar la deleción de uno o más exones. Lo anterior implica la posibilidad de buscar dirigidamente la deleción en mujeres emparentadas al caso índice, sin embargo se ha reportado que en al menos el 30% de las casos no se logra identificar a la mutación responsable¹⁶⁶. En este tipo de familias, donde no se identifica la deleción

responsable es necesario entonces recurrir al análisis de ligamiento, mediante el empleo de marcadores moleculares que identifiquen la segregación del alelo de riesgo en la familia con la finalidad de identificar mujeres en riesgo de ser portadoras del padecimiento y así otorgar un asesoramiento genético de certeza¹⁴⁶, incluso con la posibilidad de realizar diagnóstico prenatal^{4,149}.

En el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, se realiza desde hace algunos años la identificación de deleciones en el gen DMD en casos índice, así como la detección de portadoras por medio de PCR múltiple y la evaluación de dosis génica respectivamente; sin embargo existe un número importante de familias captadas en la institución (50%, n=75) en las que no se ha logrado determinar la mutación responsable; además, 25 de estas familias cuentan con historia familiar para la enfermedad o la madre es considerada como portadora por tener más de un hijo varón afectado (n=3), situación que refleja la necesidad de implementar el análisis de ligamiento como una herramienta de diagnóstico de tipo indirecto que permita la detección de mujeres portadoras.

Con el propósito de conocer la utilidad de los RFLPs/VNTR en el asesoramiento genético, la frecuencia de los polimorfismos en nuestra población, así como la frecuencia de recombinación, se analizaron en el presente trabajo tres regiones del gen DMD correspondientes a la región 5' pERT87.8/*TaqI* y pERT87.15/*XmnI* (intron 12 y 17 respectivamente) y la región 3' no traducible con

el marcador MP1P. Las familias analizadas son consideradas como representativas de nuestra población, mayoritariamente de la región centro del país.

En cuanto a las frecuencias alélicas del polimorfismo pERT87.8/*TaqI*, se encontró una semejanza estadísticamente significativa con la población hindú con una X^2 de 0.000130 ($p < 0.05$), no observándose semejanza con otros reportes internacionales. Con el polimorfismo pERT87.15/*XmnI* no se encontró similitud alguna con otras poblaciones reportadas siendo el resultado más cercano el que se obtuvo al comparar con la población japonesa, con una X^2 de 4.4045 ($p < 0.05$). En el caso del marcador MP1P, muestra una similitud a las frecuencias alélicas reportadas para la población inglesa, obteniendo una X^2 de 3.3476 ($p < 0.05$).

El análisis de haplotipos en las familias al utilizar estos tres marcadores, mostró utilidad en la segregación de los alelos para poner en evidencia eventos de recombinación intragénica, que no se lograrían observar si se analizaran los marcadores de forma aislada. El marcador MP1P (VNTR), distante de los dos RFLPs, fue el que presentó menor informatividad con 34.71% de madres heterocigotas ($n=42$), situación que consideramos dificultó la observación de un número mayor de eventos de recombinación; aunado a esto, la presencia de un alto número de familias con hijos únicos es otro factor que se suma para explicar el bajo porcentaje de recombinaciones observadas, respecto a lo reportado en la literatura mundial (5-12%)¹⁵³. Aun así, la frecuencia de recombinación puesta en evidencia fue del 2.92% (9 eventos en 308 meiosis).

De los 9 eventos de recombinación detectados en este estudio, 7 se presentaron en familias donde no se ha logrado caracterizar la mutación responsable, por lo que dependían totalmente del análisis de ligamiento para definir a las portadoras de la enfermedad. De estas 7 familias, cuatro de ellas son casos familiares, por lo que el fenómeno de recombinación dificultó la asignación de portadoras en ellas, en las restantes tres se excluyó el alelo de riesgo en una y en dos no afectó debido a la carencia de sujetos femeninos en la descendencia. La documentación real de la frecuencia de recombinación en nuestra población dada la problemática descrita, podría realizarse seleccionando para un futuro estudio únicamente a familias que cuenten con un mínimo de dos hijos(as) y con muestra del padre, así también ampliando el menú de marcadores incluyendo microsatélites en la región 5' central y 3', los cuales presentan un índice de heterocigocidad >90%, facilitando con ello la detección de un mayor número de eventos de recombinación, disminuyendo así la probabilidad de error en la asignación o exclusión del alelo de riesgo. Cabe mencionar que los microsatélites presentan la desventaja de tener una gran proporción de bandas inespecíficas producto del "patinaje" de la enzima *Taq* polimerasa, situación que podría conducir a errores en la asignación de genotipos, no obstante el beneficio puede ser mayor una vez estandarizada la técnica y utilizando siempre genotipos control.

Al ampliar el menú de marcadores, disminuiría la probabilidad de homocigocidad en madres no informativas, mejorando la asignación del alelo de riesgo y de portadoras en 11 madres homocigotas para todos los marcadores de

casos índice sin delección caracterizada (14.66%), mientras que en 6 familias (8%), probablemente ya no sea necesaria la presencia de muestra paterna. De igual manera se beneficiaría a 22 familias captadas con historia de la enfermedad y 3 con madre considerada como portadora obligada por tener 2 varones afectados en las que no se ha caracterizado la mutación responsable de la enfermedad y que dependen totalmente del análisis de ligamiento como estrategia molecular para la detección de mujeres portadoras.

Al analizar los índices de heterocigocidad, se encontró que tanto pERT87.8/*TaqI* como pERT87.15/*XmnI* presentan una informatividad de acuerdo a la esperada esto es, cercana al 50%, ya que son marcadores bialélicos (49.33% pERT87.8/*TaqI* y 54% para pERT87.15/*XmnI*). No ocurriendo lo mismo con MP1P con únicamente el 34.71% de madres heterocigotas. Pese a lo anterior, el índice de heterocigocidad global con el análisis de los tres marcadores resulto ser alto (84% n=126 madres), ya que otros estudios utilizando 3 marcadores tipo RFLPs, revelan un índice global de tan sólo el 70%¹³³.

El análisis de los haplotipos y su segregación incluyendo a los abuelos podría ayudar a explicar el origen de las mutaciones aunque, es bien sabido que en el caso de las DMD/DMB no es de esperar encontrar diferencias significativas entre las frecuencias de haplotipos de los pacientes y la población general debido a la alta frecuencia de mutaciones ocurridas a nivel germinal ya que todos los haplotipos presentan la misma probabilidad de mutación.

Un hallazgo observado en este proyecto fueron algunas diferencias entre los haplotipos de pacientes con y sin delección de exones a pesar de que globalmente no existe diferencia estadísticamente significativa; haplotipo A (delección 1.96%, no delección 8.20%), haplotipo D (delección 5.88%, no delección 14.75%) y F (delección 23.53%, no delección 11.48%), números que pudiesen conducirnos a relacionar los haplotipos A y D con mutaciones distintas a delección y al F con eventos del tipo delección, sin embargo consideramos necesario ampliar el tamaño de la muestra para poder obtener conclusiones adecuadas ya que el haplotipo A en los casos índice representa sólo el 5.22% de la frecuencia (n=6), el haplotipo D representa el 10.43% (n=12) y el haplotipo F el 16.52% (n=19), con este tamaño de muestra cualquier pequeña variación impacta sensiblemente las frecuencias de los haplotipos.

La no paternidad en estudios de ligamiento es un factor que puede conducir a errores en la asignación del alelo afectado o en riesgo, por lo que es de suma importancia realizar un interrogatorio dirigido, haciendo hincapié en la confidencialidad de la información recabada bajo el principio de no maleficencia. En este estudio se observaron 2 casos de no paternidad con los marcadores utilizados, pese a no ser altamente polimórficos, esta situación pudo estar en detrimento de una de ellas para asignar o excluir el alelo de riesgo, pues no hay mutación caracterizada, sin embargo debido a la ausencia del alelo paterno obligado y la informatividad materna, se infirió en la hija el alelo materno heredado que resulto ser el alelo de no riesgo. Cabe la pregunta de si existen un número

mayor de casos de no paternidad que hayan pasado desapercibidos con los marcadores utilizados debido a la informatividad limitada de estos marcadores, pudiendo causar falsos positivos o negativos en la asignación o exclusión del estado de portadora en la descendencia femenina.

La relevancia de éste trabajo reside en el hecho de que ha permitido asignar o excluir el alelo de riesgo en las 22 familias sin delección del gen DMD que cuentan con historia de la enfermedad y en tres más la madre es considerada como portadora por tener 2 varones afectados, por lo que el análisis de ligamiento es la única opción disponible para poder brindarles un asesoramiento genético de certeza, siendo útil en el 32% (n=8) de las familias, faltando 8 familias de otorgarles un asesoramiento genético de certeza en cuanto a la asignación o exclusión de portadoras debido a la homocigocidad de la madre para todos los marcadores (n=3), necesidad de muestra de DNA paterna (n=3) y 2 más en las que la recombinación dificulta la asignación o exclusión del alelo de riesgo. La baja informatividad familiar esto es, familias con un varón afectado sin hermanas, es un factor que va en detrimento de las cifras de la utilidad del análisis de ligamiento ya que al calcular la utilidad considerando únicamente a familias con una adecuada estructura, ésta se eleva al 50% en las familias con historia de la enfermedad y mutación no caracterizada.

Estos resultados aunados a los obtenidos en un estudio previo de PCR múltiple y dosis génica por Alcántara y cols, han permitido crear en el Instituto

Nacional de Pediatría un algoritmo diagnóstico molecular para el asesoramiento genético de certeza basado en la detección de portadoras y la realización de diagnóstico prenatal. Resultando beneficiadas 8 familias con historia de la enfermedad y mutación no caracterizada en las que se podrá hacer el seguimiento del alelo de riesgo en la familia así como realizar diagnóstico prenatal en caso de ser necesario. Igualmente se benefició a 9 familias sin historia de la enfermedad y mutación no caracterizada en las que se podrá utilizar el análisis de ligamiento en un futuro con la finalidad de confirmar o descartar el carácter hereditario de la mutación.

CONCLUSIONES

1. El presente trabajo sienta las bases para brindar análisis de ligamiento en nuestro laboratorio a familias con DMD/DMB, especialmente aquellas donde no se ha caracterizado a la mutación responsable de la enfermedad.
2. El índice de heterocigocidad global de los tres marcadores en las 150 madres analizadas fue del (84%), siendo superior a lo reportado en otros estudios que utilizan 3 RFLPs^{148,167}.
3. En las familias sin mutación caracterizada incluidas en el presente estudio (n=75), el análisis de ligamiento fue útil en el 22.66% de los casos (n=17). La utilidad real es del 43.58% al incluir únicamente a familias con adecuada estructura familiar (n=39).
4. En las familias con historia familiar de la enfermedad, madre portadora obligada y sin mutación caracterizada (n=25), el análisis de ligamiento resultó útil en el 32% de los casos (n=8). La utilidad real es del 50% al incluir únicamente a familias con estructura familiar adecuada (n=16).
5. Las frecuencias alélicas del polimorfismo pERT87.8/*TaqI* en la población mexicana resultaron ser similares a las reportadas en la población hindú, en tanto que las frecuencias alélicas de *MP1P* son semejantes a las reportadas para la población inglesa.
6. La utilidad de los RFLPs y el VNTR para el asesoramiento genético de las familias con historia de la enfermedad y mutación no caracterizada, resultó

limitada debido a la alta frecuencia de casos únicos (36% de los casos n=9 más el 12% n=3 en las que se requiere de DNA paterno).

7. La frecuencia de recombinación intragénica observada fue baja (2.92%), pudiendo estar la cifra subestimada debido a la alta homocigocidad observada en el marcador MP1P de la región 3' (63.79% de las madres analizadas).
8. La detección de 2 familias en las que se evidenció la no paternidad de 2 hijas, podría indicar familias adicionales con la misma condición que pudiesen estar pasando desapercibidas debido al carácter bialélico de los marcadores utilizados.
9. Este trabajo sienta las bases para buscar la existencia de desequilibrio de ligamiento al analizar varones sanos no emparentados en un futuro estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Scriver ChR, Beaudet AL, Sly WS (editors). The metabolic and molecular basis of inherited disease. In: The X-linked muscular dystrophies. Part 19, Chap. 140. (Vol.III). 7th. Ed. McGraw Hill Inc. 1995.
2. Bushby KMD. The muscular dystrophies. *Baillière's Clin Neurol* 1994; 3:407-430.
3. Jones KJ, North KN. Recent advances in diagnosis of the childhood muscular dystrophies. *J Paediatr Child Health* 1997; 33:195-201.
4. Holding C, Bentley D, Roberts R, Bobrow M, Mathew Ch. Development and validation of laboratory procedures for preimplantation diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 1993; 30:903-9.
5. Karpati G, Gilbert R, Petrof BJ, Nalbantoglu J. Gene therapy research for Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 1997; 10:430-5.
6. Emery AEH. The muscular dystrophies. *The Lancet* 2002; 359: 687-695
7. Jones KJ, North KN. Recent advances in diagnosis of the childhood muscular dystrophies. *J Paediatr Child Health* 1997; 33:195-201.
8. Voit T. Congenital muscular dystrophies: 1997 update. *Brain Dev* 1998; 20:65-74.
9. Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, Moreira ES, Pavanello RCM, Marie SK, Anderson LVB, Bonnemann CG, McNally EM, Nigro V, Kunkel LM, Zatz M. The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Hum Mol Genet* 1996; 5:1963-1969.
10. Jones KJ, Kim SS, North KN. Abnormalities of dystrophin, the sarcoglycans, and laminina alpha2 in the muscular dystrophies. *J Med Genet* 1998; 35:379-386.
11. Samaha FJ, Quinlan JG. Myalgia and cramps: Dystrophinopathy with wide-ranging laboratory findings. *J Child Neurol* 1996; 11:21-4.
12. Gospe SM, Lazaro RP, Lava NS. Familial X-linked myalgia and cramps: A non progressive myopathy associated with a deletion in the dystrophin gene. *Neurology* 1989; 39:1277-80.
13. Chien KR. Genotype, phenotype: upstairs, downstairs in the family cardiomyopathies. *J Clin Inv* 2003;111(2): 175-178.
14. Samaha FJ, Quinlan JG. Dystrophinopathies: Clarification and complication. *J Child Neurol* 1996; 11:13-20.
15. Haldane JBS. The rate of spontaneous mutation of a human gene. *J Genet* 1995; 31:317-26.
16. Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW. Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol* 2000;147(3):645-657.
17. Baranzini SE, Gilberto F, Dalamon V, Barreiro C, García-Erro M, Grippo J, Szynjan I. Carrier detection in duchenne and Becker muscular dystrophy in Argentine families. *Clin Genet* 1998;54:503-511.
18. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin, the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51:919-928.
19. Meryon E. On fatty degeneration of the voluntary muscles: report of the Royal Medical and Chirurgical Society 1851; Dec 9 (2): 588-589.
20. Emery AEH, Emery MLH. The history of a genetic disease: Duchenne muscular dystrophy or Meryon's disease. London: Royal Society of Medicine Press, 1995.
21. Duchenne GBA. Case 68: Paraplégie cérébrale, congénitale, hypertrophique. In: *L'électrisation localisée et de son application a la pathologie et a la thérapeutique*, 2nd edn. Paris: J-B Bailliére et Fils, 1861: 354-56.
22. Duchenne GBA. Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myosclérosique. *Archives Générales Médecine* 1868;11:5-25, 179-209, 305-21, 421-43, 552-88.
23. Thompson M.W., McInnes R.R., Willard H.F. Patrónes de herencia monogénica. En: *Genética en medicina*. Barcelona: 3^{ra} Ed. Masson. 2000:51-92.
24. Montejó PY, Zaldivar VT, Acevedo LA. Técnicas diagnósticas descritas en el estudio de la distrofia muscular de Duchenne/Becker. *Rev Neurol* 2002;34(3):278-281.
25. Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases –a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991;1:19-29.
26. Sasaki K, Sakata K, Kachi E, Hirata S, Ishihara T, Ishikawa K. Sequential changes in cardiac structure and function in patients with Duchenne type muscular dystrophy: a two-dimensional echocardiographic study. *Am Heart J* 1998; 135 (6 Pt 1): 937-44.
27. Bhattacharyya KB, Basu N, Ray TN, Maity B. Profile of electrocardiographic changes in Duchenne muscular dystrophy. *J Indian Med Assoc* 1997; 95:40-2.
28. Prior TW. Perspectives and molecular diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Clin Lab Med* 1995; 15(4):927-941.
29. Ogasawara A. Downward shift in IQ in persons with Duchenne muscular dystrophy compared to those with spinal muscular atrophy. *Am J Ment Retard* 1989; 93:544-53.

30. Bresolin N, Castelli E, Comi GP, Felisari G, Bardoni A, Perani D, Grassi F, Turconi A, Mazzucchelli F, Gallotti D, et al. Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1994; 4: 359-369.
31. Felisari G, Martinelli B, Bardoni A, Sinori M, Comi GP, Robotti M, Turconi AC, Lai M, Corrao G, Bresolin N. Loss of 140 dystrophin isoform and intellectual impairment in Duchenne dystrophy. *Neuro* 2000; 55:559-564.
32. Moizard MP, Billard C, Toutain A, Berret F, Marmin N, Moraine C. Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy?. *Am J Med Genet* 1998; 80: 32-41.
33. Becker PE, Kiener F. Eine neue X-chromosomale muskeldystrophie. *Arch Psychiatr Nevenkrankheiten* 1955;193:427-448.
34. Becker PE. Two new families of benign sex-linked recessive muscular dystrophy. *Rev Can Biol* 1962;21:551-566.
35. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener CA, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; 50:509-517.
36. Burghes AHM, Logan C, Hu X, Belfall B, Worton RG, Ray PN. A cDNA clone from the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene. *Nature* 1987; 328:434-437.
37. Mostacciuolo ML, Miorin M. Reappraisal of the incidence rate of Duchenne and Becker muscular dystrophies on the basis of molecular diagnosis. *Neuroepidemiology* 1993; 12(6):326-30.
38. Grain L, Cortina-Borja M, Forfar C, et al. Cardiac abnormalities and skeletal muscle weakness in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophies and controls. *Neuromuscul Disord* 2001;11:186-191.
39. Brooke MH, Fenichel G, Griggs RC. Clinical investigation in Duchenne dystrophy: 2. Determination of the "power" of therapeutic trials based on the natural history. *Muscle Nerve* 1983; 6:91-103.
40. Takeshima Y, Nishio H, Narita N, Wada MD, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R, Nakamura H, Matsuo M. Amino-terminal deletion of 53% of dystrophin results in an intermediate Duchenne-Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology* 1994; 44:1648-51.
41. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 2002;82:291-329.
42. Beggs AH. Dystrophinopathy, the expanding phenotype: dystrophin abnormalities in X-linked dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1997;95:2344-2347.
43. Emery AEH, Dreifuss FE. Unusual type of benign X-linked muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1966; 29: 338-342.
44. Emery AEH. Emery-Dreifuss syndrome. *J Med Genet* 1989; 26: 637-641.
45. Bione S, Maestrini E, Rivella S, et al. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1994; 8:323-27.
46. Nagano A, Koga R, Ogawa M. Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genet* 1996; 12:254-59.
47. Manilal S, Man N, Sewry C. The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Hum Molec Genet* 1996; 5:801-8.
48. Bonne G, Di Barcelatta MR, Varnous S, et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1999; 21:285-288.
49. Di Barcelatta RM, Ricci E, Galluzzi G, et al. Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1407-1412.
50. Yohanka S, Vytopil M, Bednarik J, et al. A mutation in the X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy gene in a patient affected with a conduction cardiomyopathy. *Neuromuscul Disord* 2001; 11: 411-413.
51. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988; 2:90-95.
52. Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 1995; 80:675-679.
53. Sinha S, Mishra S, Singh V, Mittal RD, Mittal B. High frequency of new mutations in North Indian Duchenne/Becker muscular dystrophy patients. *Clin Genet* 1996; 50:327-331.
54. Alcántara MA, Villarreal MT, Del Castillo V, Gutiérrez G, Saldaña Y, Maulen I, Lee R, Macías M and Orozco L. High frequency of *de novo* deletions in mexican Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Implications for genetic counseling. *Clin. Genet.* 1999; 55: 376-380.
55. Zatz M, Sumita D, Campiotto S, Canovas M, Cerqueira A, Vanizof M, Passos-Bueno MR. Paternal inheritance or different mutations in maternally related patients occur in about 3% of Duchenne familial cases. *Am J Med Genet* 1998; 78:361-365.

56. Caskey CT, Nussbaum RL, Cohan LC, Pollack L. Sporadic occurrence of Duchenne muscular dystrophy: evidence for new mutation. *Clin Genet* 1980; 18:329-341.
57. Voit T, Neuen-Jacob E, Mahler V, Jauch A, Cremer M. Somatic mosaicism for a deletion of the dystrophin gene in a carrier of Becker muscular dystrophy. *Eur J Pediatr* 1992; 151:112-116.
58. Bunyan DJ, Crolla JA, Collins AL, Robinson DO. Fluorescence in situ hybridisation studies provide evidence for somatic mosaicism in de novo dystrophin gene deletions. *Hum Genet* 1995; 95:43-45.
59. Bakker E, Van Broeckhoven C, Bonten EJ, Van De Vooren MJ, Veenema H, Van Hul W, Van Ommen GJB, Vandenberghe A, Pearson PL. Germline Mosaicism and Duchenne Muscular Dystrophy mutations. *Nature* 1987; 329:554-556.
60. Bakker E, Veenema H, Den Dunnen JT, Van Broeckhoven C, Grootsholten PM, Bonten EJ, Van Ommen GJB, Pearson PL. Germinal mosaicism increases the recurrence risk for "new" Duchenne muscular dystrophy mutations. *J Med Genet* 1989; 26:553-559.
61. Wilton, S.D., Chandler, D.C., Kakulas, B.A., and Laing, N.G. (1994). Identification of a point mutation and germinal mosaicism in a Duchenne muscular dystrophy family. *Hum Mutat* 3:133-140.
62. Van Essen AJ, Abbs S, Baiget M, Bakker E, Boileau C, Van Broeckhoven C, Bushby KMD, Clarke A, Claustres M, Covone AE, Ferrari M, Ferlini A, Galluzzi G, Grimm T, Grubben C, Jeanpierre M, Kaariainen H, Liechti-Gallati S, Melis MA, Van Ommen GJB, Poncin JE, Scheffer H, Schwartz M, Speer A, Stuhmann M, Verellen-Dumoulin C, Wilcox DE, Ten Kate LP. Parental origin and germline mosaicism of deletions and duplications of the dystrophin gene: a European study. *Hum Genet* 1992; 88:249-257.
63. Passos-Bueno MR, Bakker E, Kneppers ALJ, Takata RI, Rapaport D, Den Dunnen JT, Zatz M, Van Ommen GJB. Different mosaicism frequencies for proximal and distal Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations indicate difference in etiology and recurrence risk. *Am J Hum Genet* 1992; 51:1150-1155.
64. Bodrug SE, Holden JJA, Ray PN, Worton RG. Molecular analysis of X-autosome translocations in females with Duchenne muscular dystrophy. *EMBO J* 1991; 10:3931-3939.
65. Yoshioka M, Yorifuji T, Mituyoshi I. Skewed X inactivation in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Clin Genet* 1998; 52:102-7.
66. Gomez MR, Engel AG, Dewald G, Peterson HA. Failure of inactivation of Duchenne dystrophy X-chromosome in one of female identical twins. *Neurology* 1977; 27:537-42.
67. Richards CS, Watkins SC, Hofman EP, Scheider NR, Milsark IW, Katz KS, Cook JD, Kunkel LM, Cortada JM. Skewed X inactivation in a female MZ twin results in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1990; 46:672-681.
68. Sumita DR, Vainzof M, Campiotto S, Cerqueira AM, Canovas M, Otto PA, Passos-Bueno MR, Zatz M. Absence of correlation between skewed X inactivation in blood and serum creatine-kinase levels in Duchenne/Becker female carriers. *Am J Med Genet* 1998;80:356-361.
69. Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA. Specific cloning of DNA fragments absent from DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:4778-4785.
70. Ray PN, Belfall B, Duff C, et al. Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1985;318:672-675.
71. Walker A, Hart K, Cole C, Hodgson S, Johnson L, Dubowitz V, Bobrow M. Linkage studies in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J Med Genet* 1986; 23:538-47.
72. Den Dunnen JT. Reconstruction of the 2.4 Mb human DMD gene by homologous YAC recombination. *Hum. Mol Genet* 1992; 12:474-82.
73. Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet* 1995; 9:184-190.
74. Klamut HJ, Gangopadhyay SB, Worton RG, Ray PN. Molecular and functional analysis of the muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10:193-205.
75. Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A, Berwald-Netter Y. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature* 1990; 344:64-65.
76. Gorecki DC, Monaco AP, Derry JMJ, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet* 1992; 1:505-510.
77. Flanigan KM, Niederhausern AV, Dunn DM, Alder J, Mendell JR, Weiss RB. Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 931-939.
78. Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR. Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 1993; 16:536-538.
79. Barnea E, Zuk D, Simantov R, Nudel U, Yaffe D. Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron* 1990; 5:881-888.
80. Holder, E., Maeda, M., and Bies, R.D. Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Hum Genet* 1996;97:232-239.

81. González E, Montañéz C, Ray PN, Howard PL, García-Sierra F, Mornet D, Cisneros B. Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Letters* 2000;482:209-214.
82. Cohn RD, Cambell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2000;23:1456-1471.
83. Culligan KG, Mackey AJ, Finn DM, Maguire PB, Ohlndieck KG. Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy. *Int J Mol Med* 1998;2:639-648.
84. Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AE, Winder SJ, Kendrick JJ. Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem* 1995;20:133-135.
85. Minetti C, Beltrame F, Marcenaro G, Bonilla E. Dystrophin at the plasma membrane of human muscle fibers shows a costameric localization. *Neuromusc Disord* 1992; 2:99-109.
86. Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 1993; 122:809-823.
87. Brown RH. Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. *Ann Rev Biomed Reviews* 1997; 48:457-66.
88. Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC. Interaction of neuronal nitric oxide synthasa with caveolin-3 in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1997; 45:28187-28190.
89. Duggan DJ, Gorospe JR, Fanin M, Hoffman EP, Angelini C. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *N Engl J Med* 1997; 336:618-624.
90. Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, Hagiwara Y, Yoshida M. From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 1998; 21:421-38.
91. Worton RG. Muscular dystrophies: diseases of the dystrophin-glycoprotein complex. *Science* 1995; 270:755-756.
92. McNally EM, Sá Moreira E, Duggan DJ, Bönnemann CG, Lisanti MP, Lidov HGW, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Hoffman EP, Zatz M, Kunkel LM. Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 1998; 7:871-7.
93. Petrof BJ. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biochem* 1998; 179:111-123.
94. Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazono K, Yamada A, Kanazawa I, Kawai M. Expression of transforming growth factor- β -1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am J Pathol* 1994; 144:221-6.
95. Bulman DE, Gordon ME, Zubrzycka-Gaarn EE, Worton RG, Ray PN. Differentiation of Duchenne and Becker muscular dystrophy phenotypes with amino- and carboxy-terminal antisera specific for dystrophin. *Am J Hum Genet* 1991; 48:295-304.
96. Vainzof M, Takata RI, Passos-Bueno MR, Pavanello RCM, Zatz M. Is the maintenance of the C-terminus domain of dystrophin enough to ensure a milder Becker muscular dystrophy phenotype? *Hum Mol Genet* 1993; 2:39-42.
97. Voit, T., Stuetgen, P., Cremer, M., and Goebel, H.H. (1991). Dystrophin as a diagnostic marker in Duchenne and Becker muscular dystrophy. Correlation of immunofluorescence and Western blot. *Neuropediatr* 22:152-162.
98. Chelly J, Gilgenkrantz H, Lambert M, Hamard G, Chafey P, Recan D, Katz P, De la Chapelle A, Koenig M, Ginjaar HB, Fardeau M, Tome F, Kahn A, Kaplan JC. Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Cell* 1990; 63:1239-1248.
99. Roberts RG, Barby TFM, Manners E, Bobrow M, Bentley DR. Direct detection of dystrophin gene rearrangements by analysis of dystrophin mRNA in peripheral blood lymphocytes. *Am J Hum Genet* 1991; 49:298-310.
100. Chelly J, Gilgenkrantz H, Hugnot JP, Hamard G, Lambert M, Récan D, Akli S, Cometto M, Kahn A, Kaplan JC. Illegitimate transcription. Application to the analysis of truncated transcripts of the dystrophin gene in nonmuscle cultured cells from Duchenne and Becker patients. *J Clin Invest* 1991; 88:1161-6.
101. Nicholson LV, Johnson MA, Gardner MD, Bhattacharya S, Harris JB. Heterogeneity of dystrophin expression in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 1990; 80:239-52.
102. Prior TW, Bartolo C, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AHM, Kissel JT, Luquette MH, Tsao CY, Mendell JR. Dystrophin expression in a Duchenne muscular dystrophy patient with a frame shift deletion. *Neurology* 1997; 48:486-8.
103. Nicholson LVB, Johnson MA, Bushby KMD, Gardner-Medwin D, Curtis A, Ginjaar HB, Den Dunnen JT, Welch JL, Butler TJ, Bakker E, Van Ommen GJB, Harris JB. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. I. Trends across the clinical groups. *J Med Genet* 1993; 30:728-736.

104. Nicholson LVB, Johnson MA, Bushby KMD, Gardner-Medwin D, Curtis A, Ginjaar HB, Den Dunnen JT, Welch JL, Butler TJ, Bakker E, Van Ommen GJB, Harris JB. Integrated study of 100 patients with Xp21 linked muscular dystrophy using clinical, genetic, immunochemical, and histopathological data. II. Correlations within individual patients. *J Med Genet* 1993; 30:737-744.
105. Uchino M, Miike T, Iwashita H, Uyama E, Yoshioka K, Sugino S, Ando M. PCR and immunoblot analyses of dystrophin in Becker muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 1994; 124:225-9.
106. England SB, Nicholson LVB, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Harris JB, Davies KE. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 1990; 343:180-182.
107. Mirabella M, Galluzi G, Manfredi G, Bertini E, Ricci E, De Leo R, Tonali P, Servidei S. Giant dystrophin deletion associated with congenital cataract and mild muscular dystrophy. *Neurology* 1998; 51:592-5.
108. Banerjee M, Verma IC. Are there ethnic differences in deletions in the dystrophin gene?. *Am J Med Genet* 1997; 68:152-7.
109. Den Dunnen TJ, Grootsholten PM, Bakker E, Blonden LA, Ginjaar HB, Wapenaar MC, van Paassen HM, van Broeckhoven C, Pearson PL, van Ommen GJ. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 1989; 45:835-47.
110. Prior TW, Bartolo C, Pearl DK, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Burghes AH, Mendell JR. Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am J Hum Genet* 1995; 57:22-33.
111. Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey CT, Mandel JL. Two hot spots of recombination in the DMD-gene correlate with the deletion prone regions. *Hum Mol Genet* 1992; 1:599-603.
112. Abbs S, Yau SC, Mathew CG, Bobrow M. A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods. *J Med Genet* 1991; 28:304-311.
113. Pembrey ME. Does unequal crossing over contribute to the mutation rate in Duchenne Muscular Dystrophy?. *Am J Med Genet* 1982; 12:437-441.
114. Tihy F, Fetni R, Malfroy B, Vogt N, Dutrillaux B, Lemieux N. Non-uniform chromatin condensation on chromosomes: comparison of different loci by two-color FISH. *Am J Hum Genet* 1995; 55:120.
115. Grimm T, Meng G, Liechti-Gallati S, Bettecken T, Muller CR, Muller B. On the origin of deletions and point mutations in DMD: most deletions arise in oogenesis and most point mutations result from events in spermatogenesis. *J Med Genet* 1994; 31:183-186.
116. Mcnaughton JC, Hughes G, Jones WA, Stockwell PA, Klamut HJ, Petersen GB. The evolution of an intron: analysis of a long, deletion prone intron in the human dystrophin gene. *Genomics* 1997; 40:294-304.
117. Pizzuti A, Pieretti M, Fenwick RG, Gibbs RA, Caskey CT. A transposon-like element in the deletion-prone region of the dystrophin gene. *Genomics* 1992; 13:594-600.
118. Hu X, Ray PN, Worton RG. Mechanisms of tandem duplication in the Duchenne muscular dystrophy gene include both homologous and nonhomologous intrachromosomal recombination. *EMBO J* 1991; 10:2471-2477.
119. Roest PAM, Bout M, van der Tuijn AC, Ginjaar IB, Bakker E, Hogervorst FBL, van Ommen GJB, den Dunnen JT. Splicing mutations in DMD/BMD detected by RT-PCR/PTT: detection of a 19 aa insertion in the cysteine rich domain of dystrophin compatible with BMD. *J Med Genet* 1996; 33:935-9.
120. Tuffrey S, Chambert S, Bareil C, Sarda P, Coubes C, Echenne B, Demaille J, Clausters M. Mutation analysis of the dystrophin gene in Southern French DMD or BMD families: from Southern blot to protein truncation test. *Hum Genet* 1998; 102:334-342.
121. Todorova A, Danieli GA. Large majority of single-nucleotide mutations along the dystrophin gene can be explained by more than one mechanism of mutagenesis. *Hum Mutat* 1997; 9:537-47.
122. Roberts RG, Bobrow M, Bentley DR. Point mutations in the dystrophin gene. *PNAS USA* 1992; 89:2331-5.
123. Gardner RJ, Bobrow M, Roberts RG. The identification of point mutations in Duchenne muscular dystrophy patients by using reverse-transcription PCR and the protein truncations test. *Am J Hum Genet* 1995; 57:311-20.
124. Narita N, Nishio H, Kitoh Y, Ishikawa Y, Minami R, Nakamura H, Matsuo M. Insertion of a 5' truncated L1 element into the 3' end of exon 44 of the dystrophin gene resulted in skipping of the exon during splicing in a case of Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1993; 91:1862-1867.
125. Shashi V, Golden WL, Allinson PS, Blanton SH, von Kap-Herr CH, Kelly TE. Molecular analysis of recombination in a family with Duchenne muscular dystrophy and a large pericentric X chromosome inversion. *Am J Hum Genet* 1996; 58:1231-1238.
126. Baxter PS, Maltby EL, Quarrell O. Xp21 muscular dystrophy due to X chromosome inversion. *Neurology* 1997; 49:260-261.

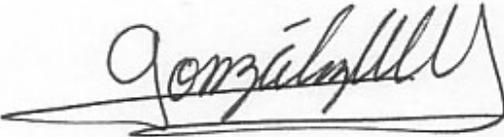
127. Kunkel LM, Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldrige J, Fischbeck KH, Bartlett D. Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1986; 322:73-85.
128. Cross GS, Speer A, Rosenthal A, Forrest SM, Smith TJ, Edwards Y, Flint T, Hill D, Davies KE. Deletions on fetal and adult muscle cDNA in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *EMBO J.* 1987; 6:3277-83.
129. Monaco AP, Bertelson CJ, Middlesworth W, Colletti CA, Aldrige J, Fischbeck KH, Bartlett D, Kunkel LM. Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 1985; 316:842-848.
130. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1990; 86:45-61.
131. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the DMD locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Ac Res* 1988; 56:135-156.
132. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (editors). PCR protocols: A guide to methods and applications. In: Optimization of PCRs; Amplification of genomic DNA; Thermostable DNA polymerases; Procedures to minimize PCR-product carry-over; sample preparation from blood, cells and other fluids; Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy; Basic equipment and supplies. Academic Press, Orlando FL, 1990.
133. Gokgoz N, Kuseyri F, Topaloglu H, Yuksel-Apak M, Kirdar B. Screening of deletions and RFLP analysis in Turkish DMD/BMD families by PCR. *Clin Genet* 1993; 43:261-266.
134. Coral-Vazquez R, Arenas D, Cisneros B, Peñaloza L, Kofman-Alfaro S, Salamanca F, Montañez C. Analysis of dystrophin gene deletion in patients from the Mexican population with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Arch Med Res* 1993; 24:1-6.
135. Kodaira M, Hiyama K, Karakawa T, Kameo H, Satoh C. Duplication detection in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients and identification of carriers with partial deletions using pulsed-field gel electrophoresis. *Hum Genet* 1993; 92:237-43.
136. Abbs S, Bobrow M. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *J Med Genet* 1992; 29:191-196.
137. Mansfield ES, Robertson JM, Lebo RV, Lucero MY, Maynard PE, Rappaport E, Parrella T, Sartore M, Surrey S, Fortina P. Duchenne/Becker muscular dystrophy carrier detection using quantitative PCR and fluorescence-based strategies. *Am J Hum Genet* 1993; 48:200-208.
138. Minaminakawa-Tachino R, Ishii K, Sakuraba H. Quantitative analysis of dystrophin gene amplification products using a PC-based image analysis system. *Int J Biomed Compu* 1993; 33:277-286.
139. Schwartz LS, Tarleton-Popovich B. Fluorescent multiplex linkage analysis and carrier detection for Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 1992; 51:721-729.
140. Calvano S, Memeo E, Piemontese MR, Melchionda S, Bisceglia L, Gasparini P. Detection of dystrophin deletion carriers using FISH analysis. *Clin Genet* 1997;52:17-22.
141. Boulay JL, Reuter J, Ritschard R, Terraciano L, Herrmann R, Rochlitz C. Gene dosage by quantitative real-time PCR. *Biotechniques* 1999;27:230-238.
142. Bennet RR, Dunnen J, O'Brien KF, Darras BT, Kundel LM. Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing. *BMC Genet* 2001;2:17.
143. Cremonesi L, Firpo S, Ferrari M, Righetti PG, Gelfi C. Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations. *Biotechniques* 1997;22:326-330.
144. Flanigan KM, Von Niederhausern A, Dunn DM, Alder J, Mendell JR, Weiss RB. Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 2003;72:931-939.
145. Perlin MW, Burks MB, Hoop RC, Hoffman EP. Toward fully automated genotyping allele assignment, pedigree construction, phase determination, and recombination detection in DMD. *Am J Hum Genet* 1994; 55:777-787.
146. Alan E, Guttmacher MD, Collins FS. Genomic medicine. *N Engl J Med* 2002; 327(23):1867-1875.
147. Kristjansson K, Chong SS, Van Der Veyver IB, Subramanian S, Snabes MC, Hughes MR. Preimplantation single cell analysis of dystrophin gene deletions using whole genome amplification. *Nat Genet* 1994;6:19-23.
148. Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, De Andrade M, Chakraborty R, Caskey CT. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1991;49:951-960.
149. Roberts R, Cole C, Hart K, Bobrow M. Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Nucleic Ac Res* 1989;17:811-812.
150. Hoffman EP, Pegoraro E, Scacheri P, Burns RG, Taber JW, Weiss L, Spiro A, Blattner P. Genetic counseling of isolated carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 1996;63:573-580.
151. Panigrani I, Mittal B. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Indian Pediat* 2001;38:631-639.

152. Oudet C, Heling R, Hanauer A, Mandel JL. Nonradioactive assay for new microsatellite polymorphisms at the 5' end of the dystrophin gene, and estimation of intragenic recombination. *Am J Hum Genet* 1991;49:311-319.
153. Abbs S, Roberts RG, Mathew CG, Bentley DR, Bobrow M. Accurate assessment of intragenic recombination frequency within the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics* 1990;7:602-606.
154. Soong BW, Tsai TF, Su Ch, Kao KP, Hsiao KJ, Su TS. DNA polymorphisms and deletion analysis of the Duchenne-Becker muscular dystrophy gene in the Chinese. *Am J Med Genet* 1991;38(4):593-600.
155. Papiha SS, Roberts DF, Clarke A, Burn J, Gardner-Medwin D, Bhattacharya SS. Population frequencies of three DNA alleles linked to the Duchenne muscular dystrophy gene. *J Med Genet* 1989;26(6):390-392.
156. Goodship J, Malcom S, Robertson ME, Pembrey ME. Service experience using DNA analysis for genetic prediction in Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 1988;25(1):14-19.
157. Tsukamoto H, Inui K, Fukushima H, Okada S. Allele frequencies of intragenic, and 5' and 3' markers of the dystrophin gene in Japanese families afflicted with Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Jpn J Hum Genet* 1996;41(4):391-397.
158. Roberts RG, Montandon AJ, Bobrow M and Bentley DR. Detection of novel genetic markers by mismatch analysis. *Nucleic Ac Res* 1989;17(15):5961-5971.
159. Kim KU, Cho MS, Chae JJ, Kin SH, Hong SS, Lee SH, Namkoong Y, Lee CC. Allelic frequencies of six (CA)_n microsatellite marker of the dystrophin gene in the Korean population. *Hum Hered* 1999;49:205-207.
160. Mukhersee M, Chaturvedi LS, Srivastavas S, Mittal RD, Mittal B. De novo mutations in sporadic deletional Duchenne muscular dystrophy (DMD) cases. *Exp and Mol Med* 2003;35(2):113-117.
161. Gene tests-GeneClinics home page. Seattle: University of Washington, 2002. (Accessed November 8, 2002, at <http://www.geneclinics.org>.)
162. Korf BR, Darras BT, Urion DK. Dystrophinopathies (includes: Duchenne muscular dystrophy (DMD), pseudohypertrophic muscular dystrophy), Becker muscular dystrophy (BMD), and X-linked dilated cardiomyopathy (XLDCM). Seattle: GeneClinics, 2000. (Accessed November 8, 2002, at <http://www.geneclinics.org/profiles/dbmd/details.html>.)
163. Emery AEH. Duchenne muscular dystrophy, 2nd edn. Oxford: Oxford University Press, 1993.
164. Howell JM, Karpati G, Kakulas BA, eds. Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1997;7:273-368.
165. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999;401:390-394.
166. Torrente Y, D' Angelo MG, Li Z, et al. Transplacental injection of somite-derived cells in mdx mouse embryos for the correction of dystrophin deficiency. *Hum Mol Genet* 2000;9:1843-1852.
167. Lindlof M, Sistonen P, de la Chapelle A. Linked polymorphic DNA markers in prediction of X-linked muscular dystrophy. *Ann Hum Genet* 1987; 51(4):317-328.

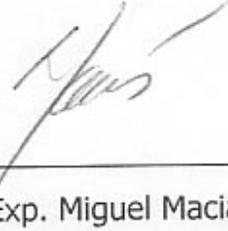
Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 16 de diciembre de 2004.



M. en C. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza
Presidente



Dra. En Biom. Mol. Ariadna Estela González del Ángel
Secretaria



M. en B. Exp. Miguel Macias Vega
Vocal